

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE  
HOUARI BOUMEDIENE**

**FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES**

# **THESE**

**PRESENTEE A L' U.S.T.H.B POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MAGISTER EN BIOLOGIE**

**OPTION : ECOBIOLOGIE ET AMELIORATION VEGETALES**

**THEME /**

**ESSAIS D'ASSAINISSEMENT DE TROIS VARIETES  
AUTOCHTONES DE VIGNE DE TABLE (*Vitis vinifera* L.)  
ATTEINTES DE VIROSES, PAR CULTURE *IN VITRO*  
DE MERISTEMES.**

**PRESENTEE PAR : M<sup>ELLE</sup> AMEDJKOUH HAFIDA  
SOUTENUE LE : 04 JUILLET 2004**

**DEVANT LE JURY D'EXAMEN**

<b>M<sup>ELLE</sup> F. AID</b>	PROFESSEUR / USTHB	PRESIDENT
<b>M<sup>ME</sup> N. BOUGUEDOURA</b>	PROFESSEUR / USTHB	DIRECTEUR DE THESE
<b>M<sup>ELLE</sup> D. MORSLI</b>	MAITRE ASSISTANTE/ USTHB	CO-DIRECTEUR DE THESE
<b>M<sup>ME</sup> H. OUZNADJI</b>	MAITRE DE CONFERENCES / USTHB	EXAMINATEUR
<b>M<sup>ME</sup> F.Z. CHAOUCH</b>	CHARGEES DE COURS / INES BLIDA	EXAMINATEUR
<b>M<sup>R</sup> B. AOUANE</b>	CHEF DE DEPARTEMENT /ITAFV	INVITE

## SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION GENERALE.....	01

### **PREMIERE PARTIE : GENERALITES**

#### **CHAPITRE I : GENERALITES SUR LA VIGNE**

1/ SYSTEMATIQUE.....	03
2/ ORIGINE DE LA VIGNE.....	05
3/ CARACTERES BOTANIQUES.....	05
3.1/ morphologie de la vigne .....	05
3.1.1/ organes végétatifs.....	05
3.1.1.1/ les racines.....	05
3.1.1.2/ la tige.....	05
3.1.1.3/ les feuilles.....	07
3.1.1.4/ les vrilles.....	08
3.1.1.5/ les bourgeons.....	08
3.1.2/ organes reproducteurs.....	08
3.1.2.1/ les fleurs et inflorescence.....	08
3.1.2.2/ le fruit : la grappe et les baies.....	10
3.2/ Le cycle de développement de la vigne.....	11
3.2.1/ la phase végétative.....	11
3.2.1.1/ les pleurs.....	11
3.2.1.2/ Le débourrement.....	11
3.2.1.3/ La croissance des pousses.....	11
3.2.1.4/ L'aoûtement.....	11
3.2.1.5/ La chute des feuilles.....	12
3.2.2/ la phase reproductrice.....	12
3.2.2.1/ L'induction florale et l'initiation florale.....	12
3.2.2.2/ Floraison et fécondation.....	12
3.2.2.3/ La nouaison.....	12
3.2.2.4/ La véraison.....	13
3.2.2.5/ La maturation.....	13
4/ MULTIPLICATION DE LA VIGNE.....	16
4.1/ Multiplication par voie sexuée ou semis.....	16
4.2/ multiplication par voie asexuée ou végétative.....	16
4.2.1/ bouturage.....	16
4.2.2/ marcottage.....	16
4.2.3/ greffage.....	16
4.3/ multiplication par culture <i>in vitro</i> .....	17

---

	Page
5/ EXIGENCES DE LA VIGNE.....	18
5.1/ facteur du milieu.....	18
5.1.1/ nature du sol.....	18
5.1.2/ la température.....	18
5.1.3/ la lumière.....	18
5.1.4/ l'eau.....	18
5.2/ facteurs culturaux.....	19
5.2.1/ entretien du sol.....	19
5.2.2/ la taille.....	19
5.2.3/ fertilisation et alimentation minérale.....	19
5.2.4/ protection du vignoble.....	20
6/ répartition.....	20
6.1/ la viticulture dans le monde.....	20
6.2/ la viticulture en Algérie.....	21
6.2.1/ origine .....	21
6.2.2/ de 1830 à 1962 .....	21
6.2.3/ après l'indépendance.....	21

## **CHAPITRE II : LES MALADIES VIRALES DE LA VIGNE**

1/ GENERALITES SUR LES MALADIES VIRALES DES PLANTES.....	23
2/ CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET PROPRIETES DES VIRUS DES PLANTES	23
3/ LES MALADIES VIRALES CHEZ LA VIGNE.....	24
3.1/ virus du court noué (GFLV).....	26
3.1.1/ Symptômes.....	26
3.1.1.1./ Les malformations ou court-noué proprement dit.....	26
3.1.1.2/ La mosaïque jaune ou panachure ordinaire.....	27
3.1.1.3/ La panachure réticulée .....	27
3.1.1.4/ Nouvelle forme symptomatologique du court noué.....	27
3.1.1.5/ Symptômes internes.....	27
3.1.2/ Agent causal et mode de transmission du virus.....	27
3.1.3/ Les effets de la maladie sur les cultures .....	30
3.2/ Virus de l'enroulement foliaire (GLRaV).....	30
3.2.1/ symptômes .....	30
3.2.2/ agent causal et mode de transmission du virus de l'enroulement foliaire ....	30
3.2.3/ Les effets de la maladie sur les cultures.....	31
3.3/ La marbrure ou Fleck.....	31
3.3.1/ Symptômes.....	31
3.3.2/ Agent causal et mode de transmission.....	32
3.3.3/ Effet de la maladie sur les cultures.....	32

---

**CHAPITRE III :**  
**❖ METHODES DE DIAGNOSTIC**  
**❖ METHODES DE LUTTE**

1/ METHODE DE DIAGNOSTIC.....	33
1.1/ détection par symptomatologie au champ.....	33
1.2/ Détection par indexage .....	33
1.2.1/ l'inoculation mécanique sur indicateurs herbacés.....	33
1.2.2/ l'indexage par greffage sur indicateurs ligneux.....	34
1.2.3/ le greffage en vert .....	35
1.2.4/ L'indexage par microgreffage de tige <i>in vitro</i> .....	35
1.3/ détection par la sérologie.....	35
1.3.1/ Le test Elisa .....	35
1.3.2/ Détection par la technique d'immuno-électromicroscopie. ....	36
1.4/ Détection par électrophorèse .....	36
1.5/ Détection basée sur l'hybridation des acides nucléiques.....	36
2/ METHODES DE LUTTE.....	37
2.1/ Sélection sanitaire.....	37
2.2/ La lutte contre les vecteurs de virus.....	38
2.1.1/ la lutte contre les nématodes.....	38
2.1.2/ La lutte contre les cochenilles.....	38
2.3/ La prémunition.....	38
2.4/La recherche de porte-greffes résistants.....	39
2.5/ Résistance induite par transfert de gènes.....	39

**CHAPITRE IV : LA CULTURE *IN VITRO***

1/ INTRODUCTION.....	40
2/ HISTORIQUE .....	40
3/ TECHNIQUES DE MULTIPLICATION PAR CULTURE <i>IN VITRO</i> .....	41
3.1/ la micropropagation.....	41
3.1.1/ multiplication par bourgeonnement axillaire.....	41
3.1.2/ multiplication par bourgeonnement adventif.....	41
3.2/ l'embryogenèse somatique.....	42
3.3/ la culture de méristèmes.....	42
3.3.1/problèmes posés par la culture <i>in vitro</i> .....	42
4/ LES CONDITIONS DE CULTURE DES TISSUS <i>IN VITRO</i> .....	43
4.1/ le milieu de culture .....	43
4.1.1/ les éléments minéraux.....	43
4.1.2/ les éléments organiques.....	44
4.1.3/ les régulateurs de croissance.....	44
4.2/ les facteurs physiques.....	46
4.2.1/ les besoins en lumière.....	46

	Page
4.2.2/ l'influence de la température.....	46
5/ CULTURE DE TISSUS, PHYTOPATHOLOGIE ET ASSAINISSEMENT DE LA VIGNE.....	46
5.1 la culture <i>in vitro</i> de méristèmes.....	46
5.2/ la thermothérapie.....	47
5.3/ microgreffage d'apex.....	47
5.4/ cultures des cellules isolées.....	48
5.5/ utilisation des inhibiteurs de la réplication virale.....	48

## DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES

1/ MATERIEL VEGETAL.....	49
1.1/ origine du matériel végétal.....	49
1.2/ caractéristiques des variétés étudiées.....	49
1.2.1/ la variété Ahmer bou amer.....	49
1.2.2/ la variété Valensi ou Mokrani.....	49
1.2.3/ Muscat de Chercell.....	50
1.3/ Préparation du matériel végétal.....	51
1.3.1/ Prélèvement et conservation du bois.....	51
1.3.2/ stratification.....	51
1.3.3/ forçage sous serre.....	51
1.3.4/ défoliation .....	51
2/ METHODES EXPERIMENTALES.....	53
2.1/ méthodes de détection des viroses.....	53
2.1.1/ méthodes d'observation des symptômes.....	53
2.1.2/ méthode biologique : Indexage par inoculation mécanique sur indicateurs herbacés .....	53
2.1.2.1/ principe.....	53
2.1.2.2/ préparation des plantes indicatrices.....	53
2.1.2.3/ préparation de l'inoculum.....	53
2.1.2.4/ mode opératoire .....	54
2.1.3/ méthode sérologique .....	55
2.1.3.1/ matériels nécessaires au test Elisa.....	55
✓ matériel végétal .....	55
✓ Les sérums utilisés .....	55
2.1.3.2/ principe du test Elisa.....	55
2.1.3.3/ mode opératoire .....	55
✓ fixation des anticorps sur la paroi de la plaque.....	55
✓ préparation de l'antigène.....	56
✓ lavage des plaques .....	56
✓ fixation des antigènes aux anticorps.....	56

	Page
✓ Fixation des anticorps conjugués à enzyme sur les antigènes.....	56
✓ Dépôt du substrat.....	56
✓ Lecture des résultats.....	57
2.2/ méthodes d'assainissement et de régénération par culture <i>in vitro</i> de méristèmes.....	59
2.2.1/technique de stérilisation.....	59
2.2.1.1/ stérilisation du matériel du laboratoire.....	59
2.2.1.2/ stérilisation des milieux de culture.....	59
2.2.1.3/ stérilisation du matériel végétal.....	59
2.2.2/ milieux de culture.....	60
2.2.2.1/ milieu de culture d'initiation.....	60
2.2.2.1/ milieu de multiplication .....	61
2.2.2.3/ milieu d'allongement et d'enracinement :.....	61
2.2.2.4/ phase d'acclimatation.....	61
2.2.3/ autres facteurs étudiés.....	61
2.2.3.1 type d'explant méristématique utilisé.....	61
2.2.3.2/ effet de la nature liquide ou solide du milieu d'initiation.....	63
2.2.3.3/ influence de la température du jour.....	63
2.2.4/ contrôle de l'état sanitaire des vitroplants obtenus.....	63
3/ TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES.....	63

## TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

1/ DETECTION DES VIROSES.....	64
1.1/observation directe des symptômes .....	64
1.1.1/ symptômes du court noué.....	64
1.1.2/ Symptômes de la marbrure.....	64
1.1.3/ Symptômes de l'enroulement foliaire .....	64
1.2/ indexage par inoculation mécanique sur indicateurs herbacés.....	69
1.3/ méthode sérologique : résultats du test Elisa.....	74
1.3.1/ résultat du test Elisa pour les trois variétés de vigne :.....	74
1.3.2/ résultat du test Elisa pour les plantes indicatrices.....	75
2/ ASSAINISSEMENT ET REGENERATION PAR CULTURE <i>IN VITRO</i> DE MERISTEMES.....	76
2.1/ la phase d'initiation et de croissance .....	76
2.1.1/ stérilisation du matériel végétal .....	76
2.1.2/ type d'explant méristématique utilisé.....	79
2.1.3/ effet de la nature solide ou liquide du milieu de culture initial.....	80
2.1.4/ influence de la température du jour.....	81
2.1.5/ influence de la concentration en substance de croissance.....	82

	<b>Page</b>
2.1.5.1/ Milieu MURASHIGE et SKOOG (1962).....	82
2.1.5.2/ Milieu CHEE et POOL (1987).....	84
2.1.6/ influence des milieux de base sur la croissance des méristèmes.....	86
2.2/ la phase de multiplication .....	89
2.2.1/effet du génotype sur le taux de multiplication.....	90
2.3/ phase d'allongement et d'enracinement.....	92
2.4/ phase d'acclimatation.....	95
3/ CONTROLE DE L'ETAT SANITAIRE DES VITROPLANTS OBTENUS.....	99
DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS GENERALES .....	101
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	105
ANNEXES.....	121

---

## **INTRODUCTION GENERALE**

La vigne (*Vitis vinifera* L.) représente sans aucun doute l'une des cultures les plus importantes et les plus répandues dans les régions à climat tempéré et elle est d'une importance économique majeure surtout dans le bassin méditerranéen.

En Algérie, comme dans l'ensemble des pays viticoles, la vigne occupe une place importante sur le plan économique. En effet, actuellement le vignoble algérien occupe une superficie de 81 550 hectares, soit 19% de la superficie agricole.

Cependant, comme beaucoup d'autres cultures, la vigne est sujette aux attaques d'un grand nombre de parasites et pathogènes, parmi lesquels les agents infectieux viraux causant de grandes pertes et menaçant la survie d'un vignoble entier (BOVEY et al., 1986).

Ces maladies sont transmises par le matériel de multiplication (greffon et porte greffe) infecté. Le risque est accru lorsqu'elles sont transmises par les vecteurs (nématodes, cochenilles, cicadelles) (MORSLI, 1995).

Les prospections réalisées dans le territoire algérien ont révélé que toutes les variétés de vignes locales sont au moins infestées par les virus du court noué et de l'enroulement foliaire ; une diminution de la production ainsi qu'une extinction progressive de certaines variétés locales ont été constatées (MARTELLI, 1985 ; MORSLI, 1995).

De plus, à la suite des mesures d'arrachage de milliers d'hectares de vignes de cuve et leur reconversion en vigne de table, avec l'introduction de nouvelles variétés de diverses provinces (Italie, France, Espagne et proche orient), les variétés autochtones disparaissent de plus en plus de nos vignobles ; la préservation de ce patrimoine variétal s'impose de manière urgente (SEMADI et BOURDJIBA, 2002).

A ce jour, seules les sélections massales et clonales ont été utilisées, aboutissant à une réduction de la perte considérable de la production et de la variabilité génétique. Pour pallier certains défauts des cultivars, il était donc nécessaire de recourir à des méthodes d'amélioration qui ne modifient pas les caractères organoleptiques et variétaux (KEDDAM, 1995).

Les biotechnologies offrent des perspectives nouvelles pour l'amélioration de la vigne, notamment pour la résistance aux pathogènes.

En effet, les méthodes de culture *in vitro* sont aujourd'hui des techniques qui offrent la possibilité d'atteindre ce but tout en cultivant un grand nombre d'individus dans un espace réduit et avec un gain de temps appréciable.

Actuellement, l'Algérie par le programme de reconversion du système agricole prévu sur cinq ans, débuté en l'an 2000, consacre une grande importance à l'arboriculture en général et à la viticulture en particulier.

---

Ce programme vise la modernisation des exploitations et leur compétitivité, mais également l'adaptation des mentalités des agriculteurs à un contexte économique en constante évolution.

En ce qui concerne le plan de reconversion, les besoins en plants exprimés par la direction des statistiques agricoles (DSA) s'élèvent à 33.182.000 plants viticoles et pour subvenir à ses besoins 29.537.000 plants viticoles seront importés.

Dans le programme de la mise en culture de la jachère (plus de trois millions d'hectares) qui touche une superficie de 700 000 hectares en première phase, la viticulture bénéficiera d'une superficie de 25 000 hectares (ministère de l'agriculture, 2000).

Ainsi et dans le cadre des activités de l'institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne (ITAFV) qui a pris en charge la conservation des variétés autochtones au sein d'une collection ampélographique et clonale dans le but de l'amélioration de leur état sanitaire, nous nous sommes fixée comme objectifs à travers cette étude :

1- de détecter la présence ou l'absence des virus par symptomatologie directe, par indexage biologique (inoculation mécanique sur indicateurs herbacés) et par le test sérologique Elisa sur trois variétés de vigne de table autochtones : Ahmar bou amar, Valensi et Muscat de Cherchell.

2- d'identifier les conditions optimales pour la mise au point de la technique de la culture *in vitro* des méristèmes pour la guérison des variétés de vignes atteintes de maladies virales.

Dans ce contexte, notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire central de l'ITAFV, qui se situe dans la région de Tessala El Merdja (Boufarik) à 20 kilomètres du sud Ouest d'Alger.

Les expériences ont été effectuées au niveau de la chambre de stratification, la serre d'élevage, la serre d'indexage, la serre d'acclimatation, laboratoire de virologie et laboratoire d'amélioration.

## **1/ SYSTEMATIQUE**

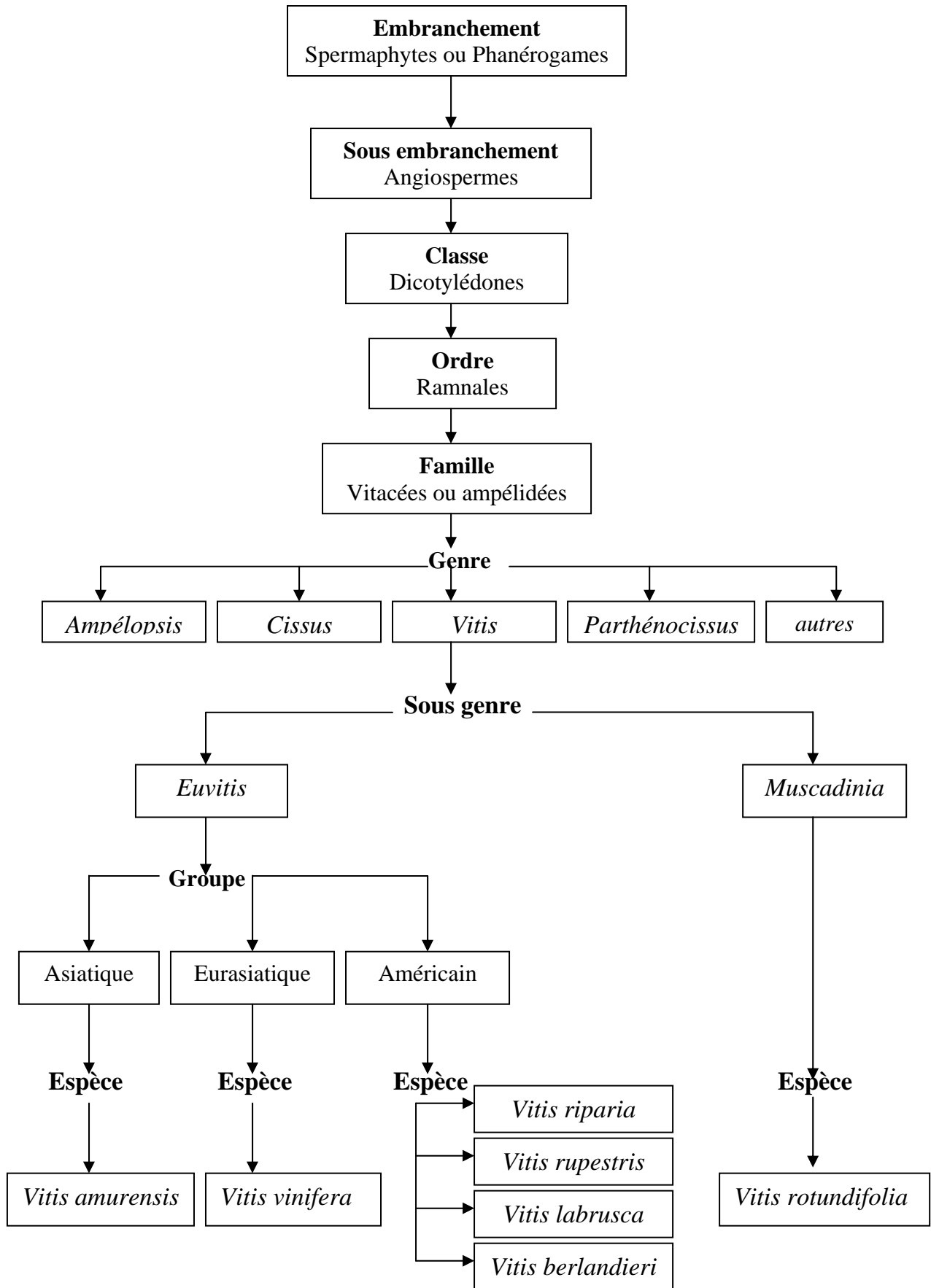
La vigne appartient à la famille des vitacées qui comprend un millier d'espèces réparties en quatorze genres dont les principaux sont : *Ampelopsis* et *Parthenocissus* (vignes ornementales), *Cissus* (vigne tropicale) et le genre *Vitis* originaire des zones tempérées de l'Asie, de l'Europe et de l'Amérique (CHAUVET et REYNIER, 1979).

Le genre *Vitis* auquel appartient la vigne est divisé en deux sous genres (CRESPY, 1992) : (Figure 01)

- Le sous genre *Muscadinia* à  $2n = 40$  chromosomes.
- Le sous genre *Euvitis* à  $2n = 38$  chromosomes.

La quasi-totalité des vignes cultivées fait partie du sous genre *Euvitis*, à l'intérieur duquel on distingue trois groupes (HUGLIN, 1986) :

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



**Figure 01 : Classification de la vigne**  
(CHAUVET et REYNIER., 1979 ; CRESPIY., 1992).

## 2/ ORIGINE DE LA VIGNE

L'histoire de la vigne accompagne l'histoire de l'humanité depuis des millénaires. On admet que la culture de la vigne a débuté il y a 4000 ans à partir des espèces sauvages du proche orient (Caucase, Asie mineure, Iran) (ABROUS, 1993).

C'est à l'époque secondaire que commence à se différencier le genre *Cissus*, ancêtre de la vigne actuelle. Les fruits des ceps servaient déjà de nourriture à nos ancêtres de l'âge de la pierre comme le témoignent les nombreux pépins retrouvés près des abris et des campements de cette époque (CRESPY, 1992).

Les pépins datés de la fin du tertiaire permettent déjà de différencier deux groupes de *Vitis* :

- 1- *Vitis ludwigii*, qui donnera les muscadinia américains
- 2- *Vitis teutonica* ancêtre des *euvtis* ou vignes vraies (CRESPY, 1992).

A la faveur des bouleversements climatiques et de la séparation des continents, *Vitis teutonica* a évolué pour former divers rameaux qui ont aboutit aux vignes actuelles qu'elles soient américaines ou eurasiatiques. En effet, c'est l'aire écologique indo-européenne qui a permis la naissance de *Vitis vinifera* (AOUF, 1984)

## 3/ CARACTERES BOTANIQUES

### 3.1/ Morphologie de la vigne (Figure 02)

#### 3.1.1/ Organes végétatifs

##### 3.1.1.1/ Les racines

Le système racinaire d'un plant issu de semis est pivotant, constitué d'une racine principale et de racelles (CHAUVET et REYNIER, 1979) ; pour les plants produits par boutures, les racines se forment principalement au niveau des nœuds et se dirigent en toutes directions de l'horizontale à la verticale (REYNIER, 1986 ; VIDAUD et al, 1993).

La croissance des racines est fonction des caractéristiques du milieu, de l'âge de la vigne et de l'activité de la partie aérienne (CHAMPAGNOL, 1984).

##### 3.1.1.2/ la tige

Un plant de vigne est appelé couramment pied ou cep. Il présente des formes très variées (HUGLIN, 1986). En effet la vigne est une liane dont la tige a tendance à s'allonger rapidement, donc elle nécessite une taille qui permet la formation d'un tronc et d'un ou de plusieurs bras (VIDAUD et al, 1993).

---

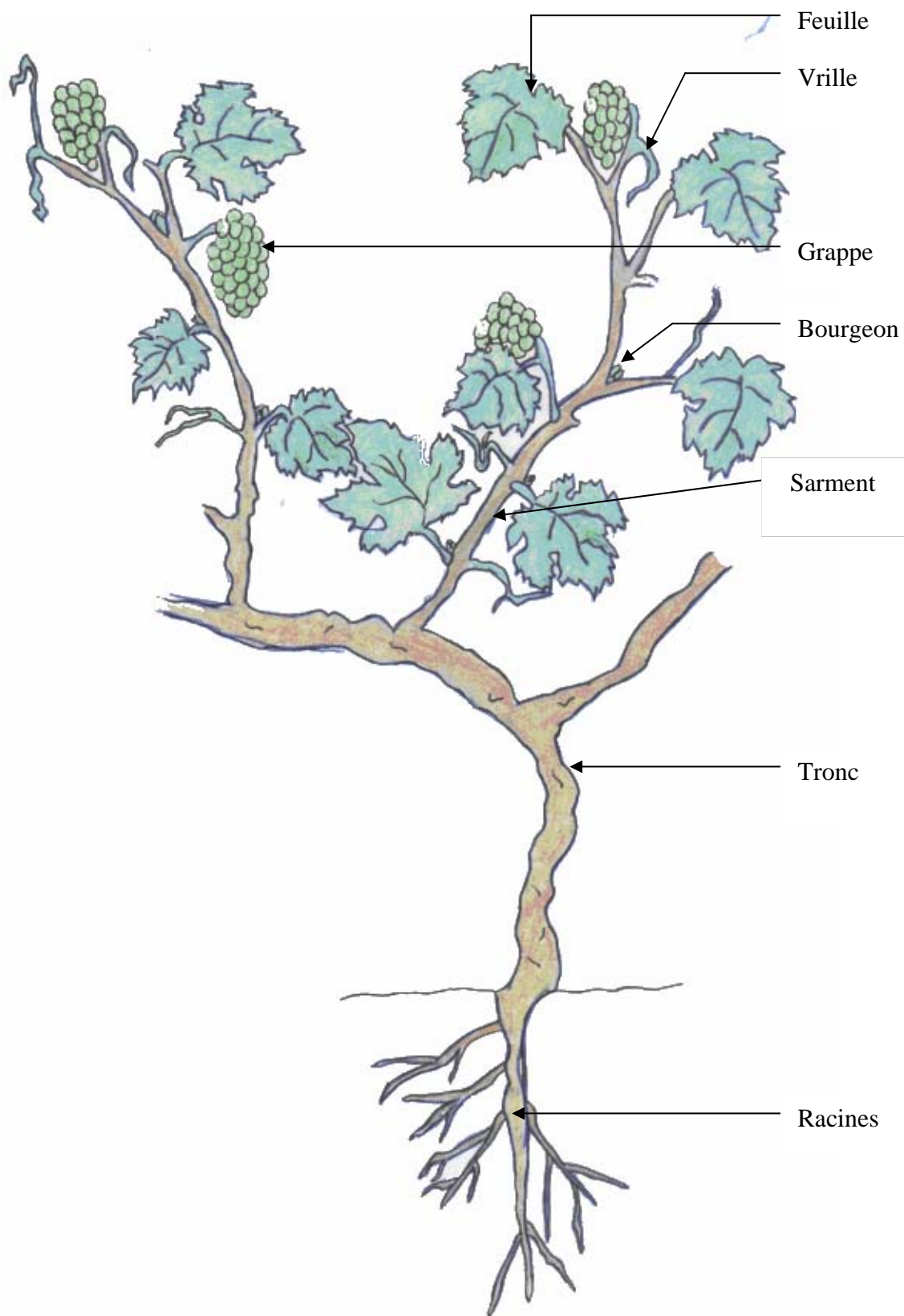
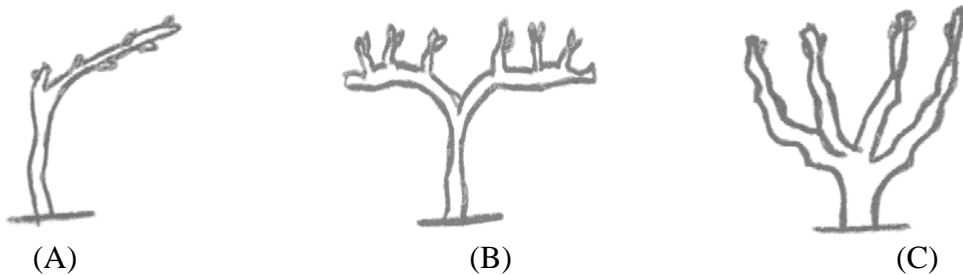


Figure 02 : Morphologie générale de la vigne (X 0.15)

Le tronc est plus ou moins tordu, il est recouvert d'une écorce d'autant plus épaisse que la vigne est âgée (HUGLIN, 1986).

Selon le système de taille adopté (Figure 03), la tige peut être simple (Guyot) ou ramifiée en bras (Royat = deux bras ou Goblet = quatre bras) ; l'ensemble tige et bras constitue la charpente du cep (CRESPY, 1992).



**Figure 03 : Système de taille de la vigne : (A) Guyot, (B) Royat, (C) Goblet (CRESPY, 1992) .**

A l'extrémité de la charpente naissent chaque année à partir des bourgeons situés sur les rameaux de l'année précédente, de nouveaux rameaux qui sont d'abord vert, tendres et riches en eau, puis prennent une teinte brune du à leur durcissement (HUGLIN, 1986 ; CRESPY, 1992).

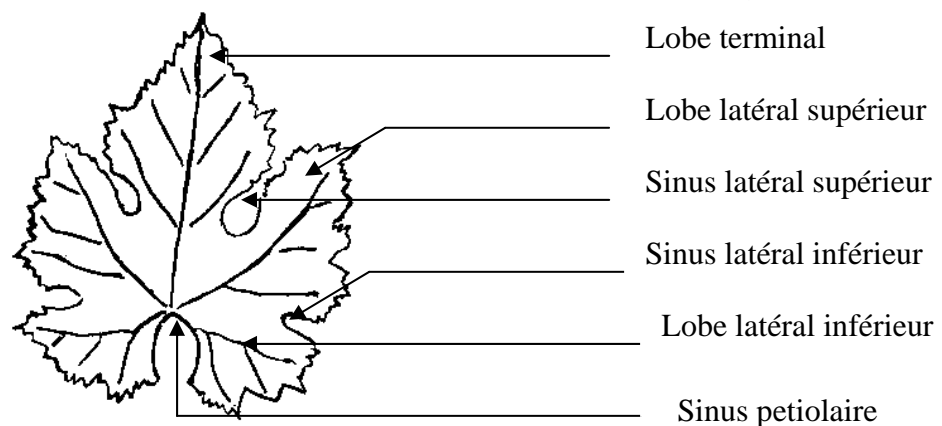
L'intervalle entre chaque niveau d'insertion foliaire s'appelle mérithalle (entre nœud), qui est plus ou moins long selon les cépages, la vigueur du cep et son état sanitaire (BRANAS, 1974 ; VIDAUD et al, 1993).

### 3.1.1.3/ Les feuilles

Les feuilles de vigne sont insérées sur le rameau au niveau des nœuds en position alterne par l'intermédiaire d'un pétiole assez long (CRESPY, 1992).

La feuille de vigne est simple, dentée et présente des sinus plus ou moins accentués ; elle porte en général cinq lobes séparés par cinq nervures (GALET, 1993).

La forme des dents, le sinus pétiolaire, la pilosité et la pigmentation fait que les feuilles sont les organes les plus utilisées en ampélographie pour la détermination des cépages (RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD, 1971; CRESPY, 1992).



**Figure 04 : Structure générale de la feuille de vigne (CRESPY, 1992).**

### 3.1.1.4/ les vrilles

En général les vrilles de la vigne sont bifurquées. Elles comprennent un pédoncule, une branche majeure située à l'aisselle d'une bractée et une branche mineure (RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD, 1971).

Les vrilles s'enroulent autour des supports auxquels elles sont accrochées à l'aide du renflement adhésif de leurs extrémités et se lignifient en même temps que les sarments (REYNIER, 1991).

### 3.1.1.5/ Les bourgeons

Les bourgeons de la vigne sont tous axillaires, ils se caractérisent par leurs possibilités de développement ; ainsi, selon RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (1971) ; HUGLIN (1986) et GALET (1993) on distingue (Figure 05) :

- un prompt bourgeon qui se développe souvent l'année même de sa formation pour donner des pousses réduites appelées entre-cœurs ou rameaux anticipés
- un bourgeon latent qui ne déboussera que l'année suivant sa formation.

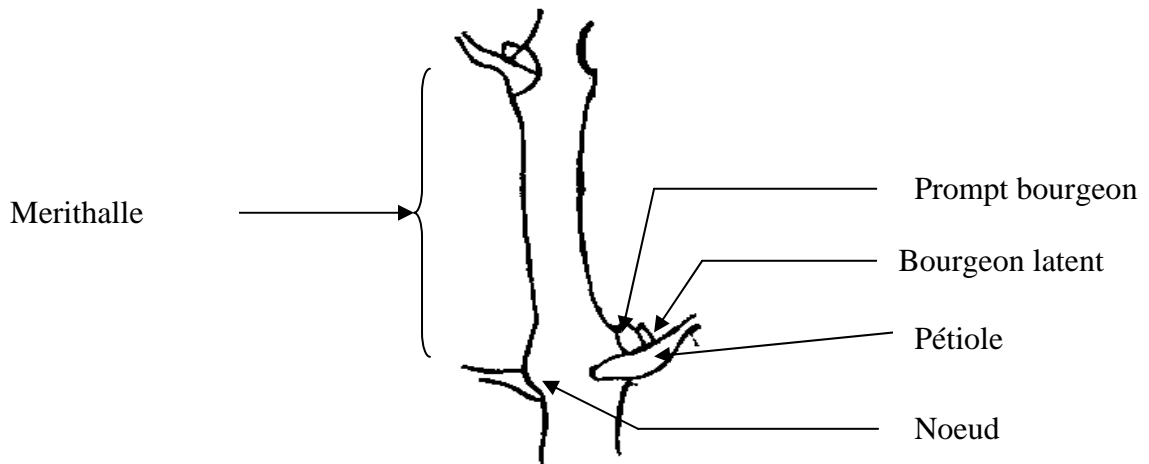


Figure 05 : Rameau de vigne (RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD., 1971).

## 3.1.2/ Organes reproducteurs

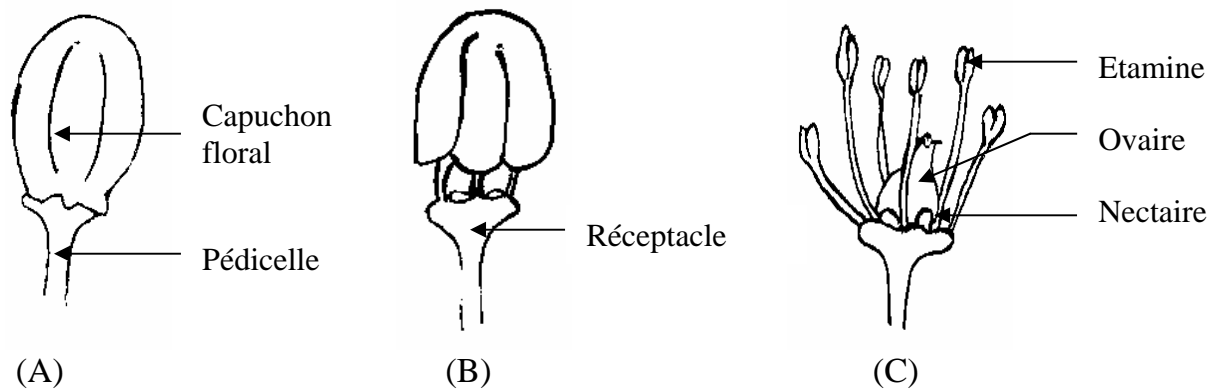
### 3.1.2.1/ Les fleurs et inflorescence

Chez *Vitis vinifera* les fleurs sont hermaphrodites, verdâtres, petites et le plus souvent elles sont pentamères avec la formule suivante (RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD, 1971 ; REYNIER, 1986) : (Figure 06 et 07)

- le calice comprend cinq sépales rudimentaires soudés entre eux.
- la corolle est formée par cinq pétales verts qui alternent avec les sépales, les pétales sont d'abord soudés entre eux donnant à la fleur une forme de capuchon, qui se détache du réceptacle floral au moment de la floraison.
- l'androcée est constitué par cinq étamines libres qui alternent avec cinq nectaires plus ou moins soudés à l'ovaire.
- le gynécée est formé de deux carpelles soudés, l'ovaire est donc biloculaire et chaque loge renferme deux ovules, le style est court, le stigmate petit et aplati.

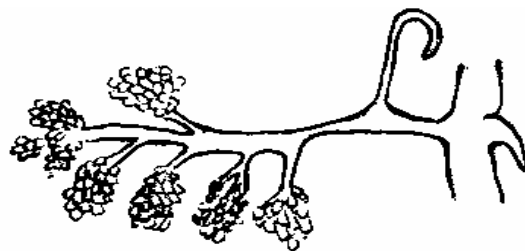


**Figure 06 : diagramme floral de la vigne (PACOTTET, 1912 in RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD., 1971)**



**Figure 07 : fleur de vigne (CRESPY, 1992): (A) bouton floral.  
(B) détachement du capuchon floral.  
(C) organes reproducteurs.**

Les fleurs chez la vigne sont toujours groupées en inflorescence (grappe) (Figure 08) assez variées en forme, en grandeur, en nombre de ses ramifications et en nombre des fleurs qu'elle porte selon les cépages (RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD, 1971 ; GALET, 1977).

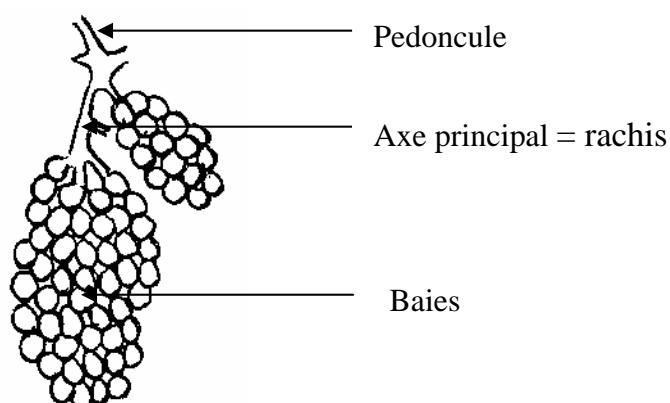


**Figure 08 : Inflorescence de la vigne.**

### 3.1.2.2/ Le fruit : la grappe et les baies

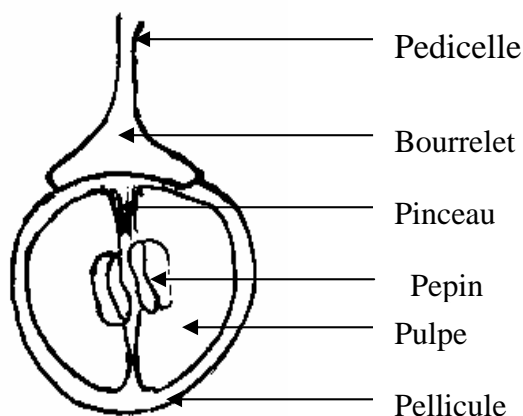
Les différentes parties de l'inflorescence acquièrent progressivement leur dimension et leur structure définitives. Ainsi les ovaires se transforment en fruit qui est une baie appelée communément grains de raisin et les ovules en graines appelées pépins. L'ensemble constitue la grappe (GALET, 1977 ; HUGLIN, 1986).

Les grappes se développent à l'opposé des feuilles comme les vrilles ; elles sont composées d'un ensemble de ramification dont on peut identifier le pédoncule ou queue de raisin, l'axe principal ou rachis et les pédicelles qui portent les baies. L'ensemble de toutes les ramifications constitue la rafle de la grappe (Figure 09) (RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD, 1971).



**Figure 09 : Grappe de vigne.**

De l'extérieur à l'intérieur de la baie (Figure 10), on trouve successivement : la pellicule, la pulpe toujours incolore, les pépins le plus souvent lignifiés au nombre de un à quatre par baie et qui peuvent être absents chez les variétés apyrènes (VIDAUD et al, 1993).



**Figure 10 : Coupe longitudinale d'une baie de vigne (CRESPY, 1992).**

La taille et la forme de la grappe (cylindrique, conique, aillée ou composée), la longueur des pédoncules, la couleur et la forme des baies constituent des critères de reconnaissance des cépages (VIDAUD et al, 1993).

### **3.2/ Le cycle de développement de la vigne**

La vigne est une plante pérenne, caractérisée par une succession de phases. L'apparition de chacune d'elles est conditionnée par la précédente aussi que par les conditions climatiques et physiologiques (VIDAUD et al, 1993).

Il apparaît deux phases qui se déroulent en même temps (CRESPY, 1992) :

- une phase végétative avec un développement des rameaux et des feuilles.
- une phase reproductive avec développement des inflorescences et des grappes.

#### **3.2.1/ La phase végétative**

##### **3.2.1.1/ Les pleurs**

A partir du mois de février jusqu'à la fin du mois de mars, dès les premiers réchauffements du sol (8°C à 12°C à 25 cm dans le sol) (VIDAUD et al, 1993), le système racinaire entre en activité ; de la sève brute circule et s'écoule par les plaies de taille : ce sont les pleurs de la vigne (Figure 11) (REYNIER, 1991 ; CRESPY, 1992).

##### **3.2.1.2/ Le débourrement**

Dès le printemps, les bourgeons latents entrent en croissance active, les écailles s'écartent pour laisser apparaître un feutrage protecteur : le coton ou « bourre » d'où le nom de débourrement (CRESPY, 1992) ; au bout de quelques jours le coton est expulsé et il apparaît une pointe verte au sommet du bourgeon latent : c'est le stade pointe verte (Figure 12) (VIDAUD et al, 1993).

##### **3.2.1.3/ La croissance des pousses**

Elle se caractérise par l'allongement des rameaux issus de bourgeons et la naissance de nouvelles feuilles (Figure 13) (GALET, 1995).

La vitesse de croissance des pousses est d'abord lente mais elle s'accélère rapidement pour atteindre son maximum juste avant la floraison (vers la fin du mois de mai à mi-juillet) (VIDAUD et al, 1993).

##### **3.2.1.4/ L'aoûtement**

C'est une phase très importante qui assure la pérennité du cep et permet sa multiplication végétative (GALET, 1993).

A partir du mois d'août, la base des sarments devient dure et brune, il s'agit d'une lignification des bois accompagnée d'une accumulation des réserves d'amidon, ceci confère au sarment une bonne résistance au froid hivernal et un débourrement normal au printemps suivant (REYNIER, 1991).

---

### **3.2.1.5/ La chute des feuilles**

En automne, les feuilles commencent à se vider de leurs substances qui migrent vers le bois ; la destruction de la chlorophylle entraîne l'apparition de pigments jaunes ou rouges selon les cépages (Figure 14) ; une couche de liège cicatricielle se forme à la base du pétiole et sous l'effet du vent ou de la pluie, les feuilles se détachent en laissant une empreinte pétiolaire sur le rameau (REYNIER, 1991 ; CRESPIY, 1992).

### **3.2.2/ La phase reproductrice**

C'est pendant la phase de croissance que se produisent des étapes intermédiaires très importantes qui caractérisent cette phase.

#### **3.2.2.1/ L'induction florale et l'initiation florale**

L'induction florale est un phénomène physiologique de la perception du stimulus déterminant la différenciation d'un méristème vers la constitution d'une inflorescence et l'initiation florale proprement dite est un phénomène morphologique de la différenciation de l'inflorescence et des fleurs, en effet c'est en fin d'été que les premiers primordia des fleurs s'individualisent (REYNIER, 1991).

#### **3.2.2.2/ Floraison et fécondation**

La floraison est l'ensemble des phénomènes physiologiques qui sont compris entre l'ouverture de la fleur (anthèse) et la fécondation, elle correspond à l'épanouissement de la fleur par l'ouverture de la corolle qui se dessèche et tombe (Figure 15) (CHAUVET et REYNIER, 1979).

Elle se produit en moyenne deux mois après le débourrement, c'est une phase qui dure environ dix jours sous une température de 18° C à 25° C et un climat bien ensoleillé, qui permettent une fécondation parfaite (CALO, 1979).

Selon VIDAUD et al (1993), la pollinisation est anémophile ; cependant, l'allogamie est obligatoire pour les cépages femelles.

#### **3.2.2.3/ La nouaison**

C'est l'ensemble des phénomènes qui permettent à l'ovaire de la fleur de se transformer en fruit (VIDAUD et al., 1993). Elle intervient quelques jours après la floraison, elle correspond à l'évolution des fleurs fécondées en fruits verts, petits et durs, qui sont riches en acide et pauvres en sucre. Ainsi, l'ovaire évolue pour donner le fruit et les ovules évoluent pour donner les pépins (CHAUVET, 1979 ; BRETANDEAU et FAURE, 1990).

---

#### **3.2.2.4/ La véraison**

Quelques jours après la nouaison, les grains tout en grossissant commencent à changer de couleur suivant les cépages, c'est la véraison (BRETANDEAU et FAURE, 1990). Ainsi, l'épiderme de la baie change de couleur de vert au rouge (pour les cépages rouges) ou au jaune (pour les cépages blancs) (Figure16).

Selon REYNIER (1991), la véraison correspond à une accumulation brusque et importante des sucres dans la baie de raisin.

#### **3.2.2.5/ La maturation**

La maturation est la période pendant laquelle le fruit subit des transformations chimiques tels que l'accumulation des sucres et la diminution de l'acidité (GALET, 1993). Durant cette période, les pépins vont atteindre leur maturité physiologique et seront apte à germer (CHAUVET, 1979).

Selon REYNIER (1991), l'évolution des composés phénoliques au cours de la maturation permet la distinction entre les cépages blancs et les cépages noirs (Figure 17).

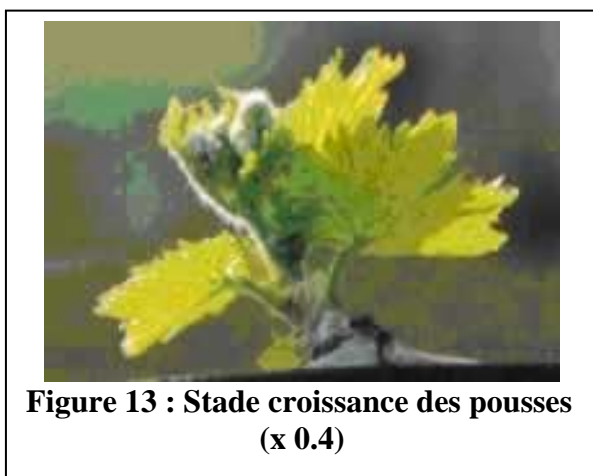
---



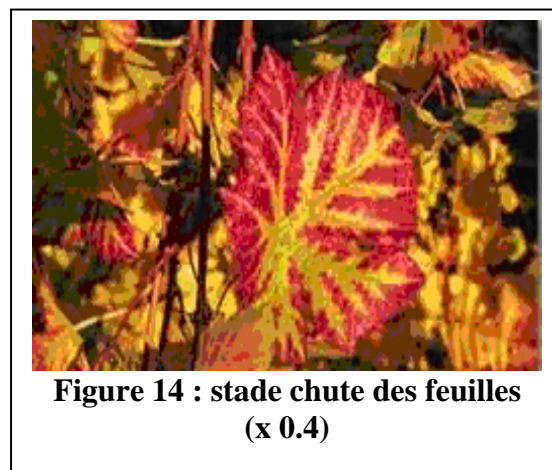
**Figure 11 : Les pleurs de la vigne**  
(x 0.25)



**Figure 12 : Stade de débourrement**  
(x 0.7)

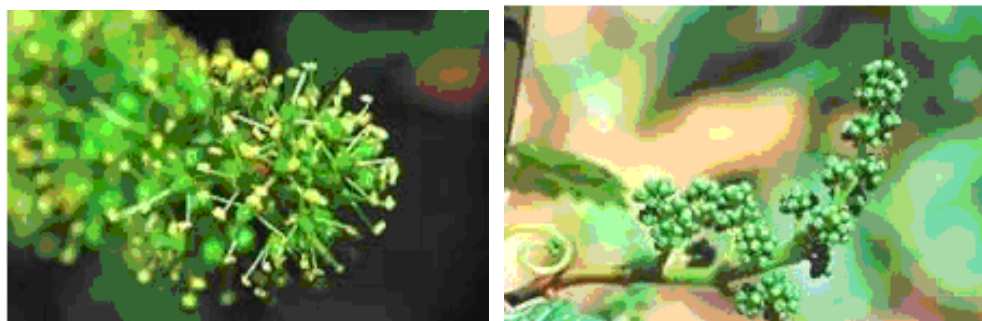


**Figure 13 : Stade croissance des pousses**  
(x 0.4)



**Figure 14 : stade chute des feuilles**  
(x 0.4)

**La phase végétative du cycle de développement de la vigne**  
([www.vignobletiquette.com](http://www.vignobletiquette.com))



(A)

(B)

**Figure 15 : stade floraison (A) et fécondation (B). (x 0.3)**



**Figure 16 : stade véraison (x 0.3)**



**Figure 17 : stade maturation (x 0.15)**

**La phase reproductrice du cycle de développement de la vigne  
([www.vignobletiquette.com](http://www.vignobletiquette.com))**

## **4/ MULTIPLICATION DE LA VIGNE**

### **4.1/ Multiplication par voie sexuée ou semis**

Cette voie consiste à créer des hybrides, c'est à dire des ceps issus de semis de pépins obtenus par fécondation sexuée (CRESPY, 1992)

Le semis ne permet pas de conserver les caractères de la plante qui a produit les pépins. Ce procédé de multiplication est réservé aux sélectionneurs et aux hybrideurs pour la création de variétés et de porte-greffes nouveaux (CLICHE, 1989 ; REYNIER, 1986).

### **4.2/ Multiplication par voie asexuée ou végétative**

#### **4.2.1/ Bouturage**

Le bouturage consiste à placer dans un milieu favorable un fragment de sarment détaché du cep, afin que se développent des racines et un système aérien identique à la plante mère (VIDAUD et al., 1993).

Les racines qui se développent sur un sarment de vigne sont des racines adventives qui apparaissent souvent près de la base de la bouture et préférentiellement au niveau des nœuds (CLICHE, 1989).

La naissance des racines dépend du milieu dans lequel se trouve la bouture (température et humidité optimale) ; cependant la reprise au bouturage dépend de la qualité des bois utilisés (aoûtement, état sanitaire), mais aussi des conditions de conservation des boutures (REYNIER, 1986).

Depuis l'invasion phylloxérique, ce procédé a beaucoup perdu de son importance, il ne peut être utilisé pour l'espèce *Vitis vinifera* que dans les sols où le phylloxera ne pullule pas (sables, sols humides) ; mais il est couramment utilisé pour la production de plants racinés de porte-greffes (REYNIER, 1986).

#### **4.2.2/ Marcottage**

Le marcottage consiste à coucher en terre, à 25-30 centimètres de profondeur, un sarment qui reste attaché au cep jusqu'à ce qu'il ait reproduit un nouveau plant.

Au bout de deux ans lorsque les racines sont suffisamment développées, le nouveau cep peut vivre seul après sevrage c'est à dire sectionnement du sarment qui rattachait la marcotte au pied mère (REYNIER, 1986).

Ce procédé est utilisable pour remplacer les pieds manquants dans les vignes plantées (CLICHE, 1989 ; REYNIER, 1986).

#### **4.2.3/ Greffage**

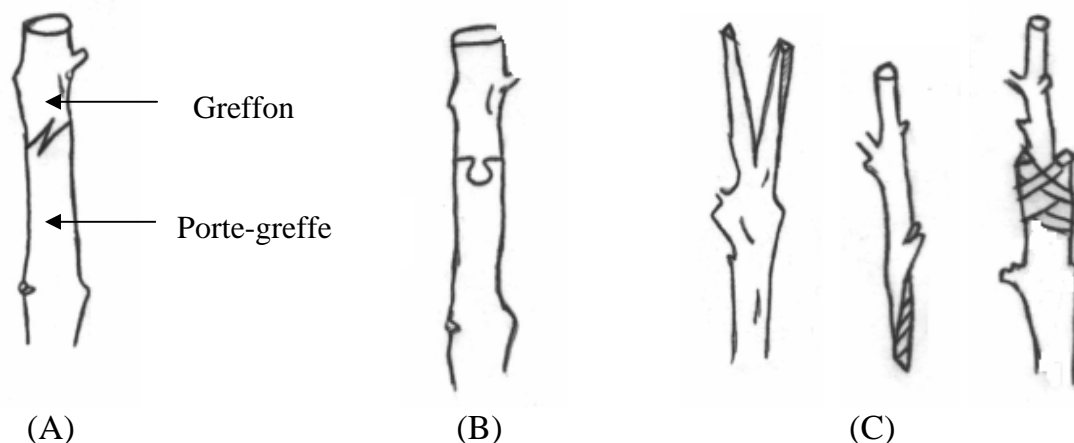
Le greffage des vignes est indispensable pour la culture de *Vitis vinifera* à cause de la présence du phylloxera dans la plupart des sols (VIDAUD et al., 1993).

Le greffage consiste à fixer une portion de sarment appelée greffon, destiné à fournir les rameaux, les feuilles et les fruits, sur une autre fraction de végétal, le porte greffe ou sujet, qui produit le système racinaire et sert de support (REYNIER, 1986).

---

Ce procédé de multiplication végétative met en œuvre le phénomène physiologique de la callogenèse qui permet la soudure entre le greffon et le porte greffe, il permet d'associer la qualité des cépages et la résistance au phylloxera des vignes américaines (REYNIER, 1986).

Les systèmes de greffage les plus employés sont le greffage en fente double ou simple, le greffage à l'anglaise, et le greffage Oméga (Figure 18) (REYNIER, 1986).



**Figure 18 : système de greffage (ABDENNOUZ, 1995): (A) greffage à l'anglaise  
(B) greffage oméga  
(C) greffage en fente.**

#### 4.3/ Multiplication par culture *in vitro*

La multiplication par culture *in vitro* des végétaux couvre des méthodes diverses permettant les unes et les autres d'obtenir des plantes entières.

La culture des méristèmes, le microgreffage d'apex, le microbouturage aboutissent généralement à une multiplication conforme des clones (MARGARA, 1989).

Les premières cultures *in vitro* de tissus de vigne furent établies par MOREL en 1944. Cependant, la culture *in vitro* en tant que méthode rapide de multiplication de la vigne fut mise au point par GALZY en 1961 ; depuis, plusieurs techniques ont été définies par plusieurs auteurs :

- le microbouturage (GALZY, 1969 ; NOZERAN et BANCILHON, 1972 ; MARTIN, 1985).
- embryogenèse somatique (MULLINS et SRINIVASAN, 1976).
- La néoformation caulinaire (FAVRE, 1977).
- La culture de fragment d'apex (BARLASS et SKENE, 1978).
- La micropropagation par bourgeonnement axillaire (HARIS et STEVENSON, 1982).
- La sélection sanitaire *in vitro* (culture de méristèmes associée ou non à la thérapie, le microgreffage d'apex) est utilisé pour la production de matériel certifié (LEBRUN, 1985).

## **5/ EXIGENCES DE LA VIGNE**

### **5.1/ Facteurs du milieu**

#### **5.1.1/ Nature du sol**

La vigne est une plante qui peut pousser sur tous les types du sol, depuis les sols secs caillouteux pauvre, jusqu'aux argilo-calcaire les plus fertiles (CLICHE, 1989 ; VIDAUD et al, 1993). Selon VIDAUD et al (1993), les caractéristiques du sol (profondeur, ressources hydriques ...) confèrent une vigueur dont l'incidence est importante sur les résultats agronomiques et commerciaux de la variété ; de ce fait, les sols bien exposés sont favorables à une production précoce.

#### **5.1.2 La température**

La vigne est une plante de climat tempéré à chaud (HUGLIN, 1986) ; d'après REYNIER (1991), la température influe quantitativement sur le métabolisme général de la souche en favorisant la croissance des rameaux, le développement des bourgeons et des organes floraux avant et après le débourrement.

Les travaux de CALO (1970) sur l'influence du climat et les conditions de nutrition sur la fécondation et la nouaison des fruits de la vigne confirment que la fertilité croît depuis 20°C jusqu'à 35°C.

#### **5.1.3 La lumière**

La vigne est une plante de plein soleil. Selon GALET (1993), l'éclairement favorise l'augmentation de la fertilité et la qualité des fruits.

Selon HUGLIN (1986), l'initiation florale est conditionnée par l'éclairement des bourgeons durant la période d'induction, par contre l'ombrage des souches au printemps diminue l'induction florale.

De plus, le soleil assèche le feuillage après une pluie ou une rosée abondante, ce qui diminue les dégâts des maladies dues aux champignons (CLICHE, 1989).

#### **5.1.4 L'eau**

Selon VIDAUD et al (1993), la vigne est assez bien adaptée à la sécheresse, elle possède un système racinaire puissant susceptible de mobiliser les réserves profondes du sol.

D'après GALET (1993), la vigne est moins exigeante en eau de pluie, elle peut supporter un minimum de 250 mm à 350 mm de pluies bien réparties au cours du cycle végétatif, notamment au printemps pour favoriser la croissance des pousses et l'élongation des rameaux.

Selon BEN ABDRABOU (1972), les besoins en eau de la vigne varient avec le climat local, la nature du sol, le cépage, le porte greffe, la vigueur de la plante et la répartition des pluies qui se situe entre 500 mm d'eau par an pour les régions méditerranéennes et 800 mm d'eau par an pour les zones humides.

---

## **5.2/ Facteurs culturaux**

Selon CHAUVET et REYNIER (1979), les travaux d'entretien de la vigne répondent à quatre préoccupations :

### **5.2.1/ Entretien du sol**

L'entretien du sol vise la maîtrise des mauvaises herbes, qui se comportent en effet comme des véritables parasites établissant à l'égard de la culture une concurrence vis à vis de l'alimentation en eau et en substances minérales (VIDAUD et al, 1993).

Selon CHAUVET et REYNIER (1979), le viticulteur s'applique à pratiquer quatre sortes d'opérations culturales :

- ✓ Chaussage ou buttage à l'automne : ayant pour but de ramener la terre vers les cep, les protéger contre les gelées de l'hivers et enfuir les engrais.
- ✓ Déchaussage ou débutage au printemps : se pratique afin de créer une couche meuble, en dégagant les ceps de la terre qui les recouvraient pendant l'hiver.
- ✓ Binage ou travail du sol en cours de végétation : il permet d'ameublir le sol, de le nettoyer en enfouissant les mauvaises herbes, de l'aérer et de favoriser la circulation de l'eau.
- ✓ L'enherbement et couverture du sol : dans certaines situations, l'occupation du sol par un tapis végétal (exemple : la luzerne) est recherchée pour limiter l'érosion et le ruissellement des eaux.

### **5.2.2/ La taille**

La vigne est une liane qui acquière un grand développement ; la production de bois prend alors le pas sur la production des fruits qui devient très irrégulière et faible par rapport à l'espace occupé par la souche (REYNIER, 1991).

La taille consiste à supprimer totalement ou partiellement certains organes de la vigne (rameaux, sarments, bourgeons, feuilles et grappes) pour régler l'allongement, l'encombrement du cep et de régulariser une production annuelle. Elle permet éventuellement la pérennité de la souche (CHAMPAGNOL, 1984).

En fait, la taille nécessite une extrême précision dans le choix des bois, le nombre des yeux et leurs répartitions (RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD, 1971).

### **5.2.3/ Fertilisation et alimentation minérale**

La vigne est l'une des plantes les moins exigeantes en éléments fertilisants, elle peut mettre en valeur des terres relativement pauvres (HUGLIN, 1986) ; indépendamment de la fumure de fond (fumure organique : fumier, fumure minérale : phosphore et potasse, engrais vert : fourrage à croissance rapide exemple : les légumineuses) qui sera incorporée lors de la préparation du terrain, il serait indispensable de compléter périodiquement (tous les ans ou les deux ans) par des fumures d'entretien (différents éléments nécessaires au développement Exemple : azote ammonitrate) (BRETANDEAU et FAURE, 1990).

---

### 5.2.4/ Protection du vignoble

Comme toutes les espèces cultivées, la vigne est aussi menacée par un certain nombre d'accidents et ennemis divers, dont les dégâts sont parfois si importants qu'ils affectent non seulement la production qui peut être altérée ou détruite mais aussi la pérennité de la plante (VIDAUD et al, 1993).

Ainsi, dans le cadre de la recherche d'une production importante et de bonne qualité, le viticulteur doit apporter tous les soins pour le choix des cultivars résistants aux maladies et aux divers parasites qui menacent les vignobles (CRESPY, 1992).

La vigne peut être attaquée par :

- ✓ les maladies à mycoplasmes (flavescence dorée) (CAUDWELL et LARRUE, 1979).
- ✓ les maladies cryptogamiques (mildiou, oïdium, esca...etc.) (FARETRA, 1995).
- ✓ les maladies bactériennes : *Xanthomonas ampelina*, *Agrobacterium tumefaciens* (GALET, 1977).
- ✓ les parasites animaux (acariens, nématodes, pucerons ...etc.) (LAFON et al., 1970).
- ✓ les dégâts dus aux conditions météorologiques (gel, brûlures de soleil, sécheresse) (BOVEY et al., 1980).
- ✓ les carences en bore, en zinc, en fer, en manganèse ...etc. (RYSER et BASLER, 1990).

Ainsi, dans le cadre de la recherche d'une production importante et de bonne qualité, le viticulteur doit apporter tous les soins pour le choix des cultivars résistants aux maladies et aux divers parasites qui menacent les vignobles (CRESPY, 1992).

## 6/ REPARTITION

### 6.1/ La viticulture dans le monde

La superficie totale du vignoble mondial est de neuf millions d'hectares réparties sur 35 états (EYNARD, 1990)

Selon REYNIER (1991), la production mondiale est d'environ 60 millions de quintaux de raisins dont :

- ✓ 33 millions de tonnes sont vinifiées
- ✓ 8 millions de tonnes sont consommées frais
- ✓ 6 millions de tonnes sont séchées
- ✓ le reste est destiné à différentes fabrications (jus et concentré de raisins)

**Tableau 01 : Les principaux pays producteurs (VIDAUD et al, 1993)**

Pays producteurs	Production (en tonnes)	Exportation (en tonnes)
ITALIE	1.400.000	400.000
CHILI	650.000	450.000
ETATS UNIS	550.000	200.000
ESPAGNE	470.000	90.000
GRECE	270.000	120.000
FRANCE	120.000	15.000
ALGERIE	150.000	réservés aux marchés intérieurs
MAROC	150.000	

## **6.2/ La viticulture en Algérie**

### **6.2.1/ Origine**

Depuis la haute antiquité, la vigne existait en Algérie, dans des collines préservées du feu et des troupeaux, des vignes sauvages s'accrochaient aux arbres, leurs petites grappes aux grains compacts, noirs étaient cueillies et consommées fraîches ou séchées au soleil. (BIRBENT, 2001).

L'Algérie doit ses premiers plants de vignes aux phéniciens, lesquels au cours de leur installation sur les côtes ont initié la culture de la vigne et introduit des cultivars orientaux qui au cours des siècles ont donné naissance à des variétés locales (BIRBENT, 2001).

### **6.2.2/ De 1830 à 1962**

Selon AOUF (1984), la culture de la vigne a connu de grands moments en Algérie, dus à un petit puceron (le phylloxera) qui aurait en 20 ans détruit plus de 150 000 hectares du vignoble français, raison qui poussera les colons français installés en Algérie à développer le vignoble algérien et l'orienter exclusivement vers la production du vin destiné à l'approvisionnement du marché français.

La vigne à cette même époque était négligeable, ne couvrant que 5 000 hectares avec une production de 30 000 tonnes dont 10 000 étaient exportées.

### **6.2.3/ Après l'indépendance**

En 1962, l'Algérie ayant hérité d'un vignoble colonial, a adopté une nouvelle politique viticole qui consiste à réduire la superficie viticole à moins de 50 000 hectares en éliminant les vignes de cuves pour les remplacer par d'autres cultures stratégiques tel que les céréales et les cultures maraîchères (AGGAD, 1988) et à développer la production des raisins de table pour la consommation locale (KERBOUA, 1987).

Ainsi, de 1962 à 1985, le secteur viticole a connu des bouleversements profonds liés aux nouvelles données politiques, économiques et sociales du pays. Cette situation s'est caractérisée par une importante régression des vignobles dont les superficies sont passées de 350 000 hectares en 1965 à 21 500 hectares en 1977 et 170 000 hectares en 1985 (ABROUS, 1993).

En 1989, la superficie occupée par le vignoble au niveau national est de l'ordre de 35 000 hectares avec un rendement de 88.5 quintaux par hectare, à cette réduction de superficie s'ajoute la baisse constante de rendement en raison de vieillissement du vignoble algérien qui date depuis l'époque coloniale et à la présence de problèmes phytosanitaire (SAMADI et BOURDJIBA, 2002).

---

Actuellement, le vignoble algérien occupe une superficie de 81 550 hectares, soit 19% de la superficie agricole. La majorité de ces terres est située à l'ouest (53%) (Ain Temouchent, Mascara, Mostaganem, Sidi Bel Abbas, Tlemcen et Oran), alors que 40% sont situées au centre (Médéa, Tizi Ouzou, Boumerdes, Blida, Chlef, Tipaza, Ain Defla et Alger) et 7% dans la région est (Jijel, Skikda et Annaba) (STATISTIQUES AGRICOLES, 2002).

**Tableau 02: Statistiques agricoles, 2002**

<b>Vignes</b>	<b>Superficies (hectares)</b>	<b>Production (quintaux)</b>	<b>Rendement (quintaux/hectare)</b>
<b>Vigne de table</b>	41 860	1 881 390	95.2
<b>Vigne à vin</b>	38 010	458 510	20.6
<b>Vigne à raisin de séchage</b>	120	4 070	37
<b>Plants de pieds mères</b>	1 560		

## **1/ GENERALITES SUR LES MALADIES VIRALES DES PLANTES**

Les maladies à virus présentent un grand intérêt économique chez les végétaux, car de nombreuses plantes sont affectées.

C'est en 1886 que Mayer découvre la nature de l'agent pathogène en étudiant la mosaïque du tabac, et c'est vers cette époque que le terme de virus a commencé à être employé (GALET, 1977 ; CORBAZ, 1990).

Les recherches sur les maladies virales se sont poursuivies activement dans le monde entre 1919 et 1939, période pendant laquelle de nombreuses maladies furent identifiées. Après 1945, l'emploi du microscope électronique a permis d'obtenir des micrographies montrant les structures variées des virus (particules géminées : Géminivirus ; particules flexueuses allongées : Potyvirus ; particules en bâtonnet rigides : Tobamovirus ; virus bacilliformes : Rhabdovirus) (LEVADOUX et al. , 1971 ; GIRARD et al, 1989 ; CORBAZ, 1990).

Aujourd'hui de nombreux virus peuvent infecter de nombreuses plantes cultivées ; certains d'entre eux ont une gamme d'hôte très restreinte : ils n'infectent en conditions naturelles qu'une seule ou un nombre limité d'espèces végétales : c'est le cas du GFLV (grapevine fanleaf virus) , l'un des virus du court noué de la vigne ; d'autres virus sont capables d'infecter de nombreuses espèces végétales : c'est le cas de l'ArMV (arabis mosaic virus) virus proche du GFLV qui provoque des symptômes de court noué chez la vigne et qui infecte d'autres espèces telle que la betterave (WALTER et al., 2000).

## **2/ CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET PROPRIETES DES VIRUS DES PLANTES**

Les virus sont des agents infectieux, constitués par un matériel d'information génétique, comprenant une molécule d'acide nucléique DNA ou RNA qui peut être associée à des protéines. Ces particules sont entourées d'une coque protéique appelée capsid (CORBAZ, 1990 ; GALET, 1995).

Le virus est un parasite obligatoire, qui va obliger la cellule hôte à reproduire les acides nucléiques et les autres constituants du virus qui vont s'assembler ensuite pour donner de nouveaux virus (GIRARD et al., 1989, CORBAZ, 1990).

Le virus envahit la totalité de la plante infectée, en passant de cellule à cellule. Mais la multiplication du virus et sa dissémination dans les tissus peuvent être plus lentes que la multiplication cellulaire de la plante. C'est ainsi que les méristèmes apicaux sont souvent exempts de virus (MOREL et MARTIN, 1952).

Le détournement par le virus du métabolisme cellulaire de la plante hôte et la multiplication du virus dans certains tissus de cet hôte aboutissent à des perturbations physiologiques qui peuvent affecter la plante infectée à des degrés divers ; ces perturbations se traduisent par des symptômes qui se manifestent sur les organes de la plante (symptômes externes) ou bien au niveau cellulaire (symptômes internes) (GALET, 1995; WALTER et al., 2000).

---

### **3/ LES MALADIES VIRALES CHEZ LA VIGNE**

Les maladies virales constituent le plus grand problème de la vigne dans le monde, car aucune lutte chimique ne peut être envisagée (MARTELLI, 1985).

Ces viroses sont à l'origine de pertes importantes de récoltes et d'altérations qualitatives des fruits (WALTER, 1988) ; ainsi elles diminuent la vigueur de la vigne, sa longévité et sa productivité (MARTELLI, 1985).

La vigne est l'espèce ligneuse qui peut héberger le plus grand nombre de virus (CLOQUEMIN et al., 1998) ; une cinquantaine de virus ont été identifiés, ils appartiennent à des genres variés (WALTER et al. , 2000). Tableau 03

**Tableau 03: les virus de la vigne et leur classification systématique  
(WALTER et al, 2000)**

<b>Famille</b>	<b>Genre</b>	<b>Espèce</b>	
<b>VIRUS APPARTENANT A DES GENRES CLASSES EN FAMILLES</b>			
BROMOVIRIDAE	<i>Alfavirus</i>	<i>Alfalfa mosaic</i>	(AMV)
	<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic</i>	(CMV)
	<i>Ilarvirus</i>	<i>Grapevine line pattern</i>	(GLPV)
BUNYAVIRIDAE	<i>Tospovirus</i>	<i>Tomato spotted wilt</i>	(TSWV)
COMOVIRIDAE	<i>Fabavirus</i> <i>Nepovirus</i>	<i>Broadbean wilt</i>	(BBWV)
		<i>Arabis mosaic</i>	(ArMV)
		<i>Artichoke Italian latent</i>	(AILV)
		<i>Blue berry leaf mottle</i>	(BBLMV)
		<i>Grapevine Bulgarian latent</i>	(GBLV)
		<i>Grapevine chrome mosaic</i>	(GVMV)
		<i>Grapevine fanleaf</i>	(GFLV)
		<i>Grapevine Tunisian ringspot</i>	(GTRV)
		<i>Peach rosette mosaic</i>	(PRMV)
		<i>Raspberry ringspot</i>	(RRV)
		<i>Tobacco ringspot</i>	(TRSV)
		<i>Tomato black ring</i>	(TBRV)
		<i>Tomato ringspot</i>	(ToRSV)
<i>Strawberry latent ringspot</i>	(SLRSV)		
TOMBUSVIRIDAE	<i>Tombusvirus</i>	<i>Petunia asteroid mosaic</i>	(PAMV)
		<i>Grapevine Algerian latent</i>	(GALV)
	<i>Carmovirus</i>	<i>Carnation mottle</i>	(CarMV)
	<i>Necrovirus</i>	<i>Tobacco necrosis D</i>	(TNV-D)
CLOSTÉROVIRIDAE	<i>Closterovirus</i>	<i>Grapevine leafroll associated- 2</i>	(GLRaV-2)
	<i>Vinivirus</i>	<i>Grapevine leafroll -1,3,4,5</i>	(GLRaV-1,3,4,5)
	<i>Crinivirus</i>	<i>Grapevine leafroll - 7</i>	(GLRaV-7)
<b>VIRUS APPARTENANT A DES GENRES QUI NE SONT PAS CLASSES EN FAMILLES</b>			
	<i>Sobemovirus</i>	<i>Sowbane mosaic</i>	(SoMV)
	<i>Potexvirus</i>	<i>Potato X</i>	(PVX)
	<i>Tobamovirus</i>	<i>Tobacco mosaic</i>	(TMV)
		<i>Tomato mosaic</i>	(ToMV)
	<i>Trichovirus</i>	<i>Grapevine berry internal necrosis</i>	(GBINV)
	<i>Vitivirus</i>	<i>Grapevine A/B/C/D</i>	(GVA/B/C/D)
	<i>Foveavirus</i> (genre à créer)	<i>Grapevine rupestris stem pitting associated ( GRSPaV)</i>	
		<i>Grapevine fleck</i>	(GFKV)
		<i>Grapevine asteroid mosaic associated</i>	(GAMV)
			<i>Grapevine redglobe</i>
<b>VIRUS QUI NE SONT PAS CLASSES TAXONOMIQUEMENT</b>			
		<i>Grapevine ajinashika</i>	(GAV)
		<i>Grapevine stunt</i>	(GSV)
		<i>Grapevine labile rod-shaped</i>	(GLRSV)
		<i>Unidentified isometric grapevine</i>	(UIGV)

### 3.1/ virus du court noué (GFLV)

#### 3.1.1/ Symptômes

La dégénérescence infectieuse, appelée couramment court-noué, est la maladie qui engendre le plus de dégâts sur la vigne. Elle est répandue dans le monde entier et peut affecter tous les cépages de vignes (BOVEY et al. , 1974 ; HABERT, 1992 ; BOUBALS, 2001).

Le court noué se manifeste par une série de symptômes repartis en trois syndromes principaux et qui se manifestent sur les divers organes de la vigne infectée (MARTELLI, 1992) :

##### 3.1.1.1/ Les malformations ou court-noué proprement dit

Elles sont causées par une souche déformante du virus du GFLV (MARTELLI, 1985).

###### ❖ *Sur les feuilles*

La maladie se manifeste par des déformations diverses :

- sinus pétiolaire élargi, nervures principales rapprochées donnant à la feuille l'aspect d'un éventail ouvert d'où le terme anglais «fanleaf» (BOVEY et al. , 1980 ; MARTELLI, 1992).
- les limbes sont souvent asymétriques, gaufrés, avec dentelures aiguës des bords (WALTER et al., 2000).
- un accroissement du limbe par un dédoublement des nervures, qui vont passer de 5 à 10 donnant alors une feuille double (GALET, 1977, 1983) ; Ou au contraire, par un rétrécissement du limbe du à une diminution des écarts angulaires. Il s'agit alors de feuilles en palmette (BRUGNON et BESSIS, 1968 ; RIVES, 1971, REYNIER, 1991).

###### ❖ *Sur les pousses*

Le court-noué provoque un raccourcissement des entre-nœuds (BOVEY et MARTELLI, 1992). Les rameaux malformés montrent des bifurcations anormales, fasciations (= aplatissements), et développement en zigzag (GUGERLI et al. , 1990 ; MORSLI, 1990 ; MARTELLI et SAVINO, 1990).

Cette virose peut affecter aussi les vrilles qui peuvent être fasciées ; de même la vrille normalement située sur le nœud à l'opposé d'une feuille peut se déplacer jusqu'au milieu d'un mérithalle (= entre-nœud) (GALET, 1995).

De plus, le rabougrissement des sarments (= branches lignifiées), donnent aux plantes une forme buissonnante (CARLES, 1985).

###### ❖ *Sur les grappes*

D'après HABERT (1992), les grappes sont moins nombreuses et plus petites que chez les vignes saines. Le virus du court-noué entraîne souvent le millerandage qui est dû à une absence ou à une mauvaise fécondation des fleurs et la coulure qui est un avortement des fleurs non fécondées (ABRACHEVA, 1992).

---

### 3.1.1.2/ La mosaïque jaune ou panachure ordinaire

Elle est causée par une souche chromogène du virus du GFLV (MARTELLI et SAVINO, 1990) ; c'est un symptôme caractérisé par un jaunissement total ou partiel des feuilles, qui se développe au printemps et qui provoque des éclaircissements au niveau du limbe (CARLES, 1985 ; GALET, 1983). Ce jaunissement concerne tous les organes néoformés : feuilles, rameaux, vrilles et inflorescences (MARTELLI, 1992).

### 3.1.1.3/ La panachure réticulée

Causée elle aussi par une souche chromogène du virus du GFLV (MARTELLI, 1985) ; ce symptôme est représenté par des petites taches jaunes chromes localisées tout au long des nervures principales des feuilles adultes. Ces décolorations se manifestent en début de l'été (BOVEY et MARTELLI, 1992 ; MARTELLI, 1992).

### 3.1.1.4/ Nouvelle forme symptomatologique du court noué

Les symptômes concernent essentiellement la morphologie foliaire et l'architecture de la tige : les déformations peuvent être symétriques ou pas, le sinus pétiolaire tend à s'ouvrir d'avantage, avec réduction de croissance latérale, ce qui conduit à une forme lancéolée caractéristique (TORREGROSA et al., 2000).

Les feuilles les plus touchées prennent une texture épaisse et craquante et une couleur vert sombre.

D'après TORREGROSA et al. (2000), l'architecture de la tige et la disposition des organes caulinaires sont affectées par le démarrage de nombreux entre cœurs à la base desquels les bourgeons latents prennent un aspect surdimensionné.

La longueur des entre nœuds étant réduite par rapport à la normale, les ceps présentent un aspect buissonnant et les rameaux ont des profils en « balai de sorcière ».

### 3.1.1.5/ Symptômes internes

Au niveau interne, l'examen de coupes transversales effectuées dans des sarments de vigne infectée révèle la présence de cordons endocellulaires qui sont plus abondants dans les entre nœuds de la base des sarments et sont facilement observés dans les vaisseaux du bois et qui apparaissent sous forme de filaments disposés radialement ; leur absence n'est pas une preuve de l'absence de virus (BOVEY et al., 1980 ; GALET, 1995 ).

### 3.1.2/ Agent causal et mode de transmission du virus

Douze virus différents sont responsables des syndromes de dégénérescence ou de dépérissement (Tableau 04) (WALTER et al., 2000).

Le court noué, proprement dit est provoqué par le grapevine fanleaf népovirus GFLV qui se transmet par les nématodes du genre *Xiphinema* (ESMENJAUD, 1983).

---

Deux espèces du genre *Xiphinema* ont été reconnues comme vectrices du virus du court-noué : *Xiphinema index* (VUITTENEZ, 1984 ; MARTELLI, 1994) et avec moindre efficacité le *Xiphinema italiae* (MARTELLI, 1985 ; 1994).

L'arabis mosaïque virus ArMV est un deuxième népovirus qui provoque des symptômes souvent très semblables à ceux provoqués par le GFLV (WALTER et al, 1996) et qui se transmet par le nématode *Xiphinema diversicaudatum* (MARTELLI, 1994).

Les nématodes sont des vers microscopiques qui pour se nourrir, piquent les racines et transmettent alors le virus des plants contaminés à des plants sains (VUITTENEZ et al. , 1972 ; GIRARD et al. , 1989 ; HABERT, 1992).

La contamination par des nématodes est due soit à leur présence dans la parcelle au moment de la plantation, soit qu'ils ont été apportés ultérieurement dans le sol de la parcelle (VUITTENEZ, 1984).

Cependant les nématodes vecteurs du court noué peu mobiles par leurs propres moyens, peuvent être entraînés sur de longues distances par les eaux de ruissellement, les eaux souterraines et les transports de terre (par les travaux ou les inondations) (BOVEY et al, 1980).

Le virus du court-noué est transmis aussi par le greffage ; ainsi l'utilisation de matériel de multiplication contaminé (boutures de portes-greffes et de greffons) conduit à une dissémination rapide de la maladie de vignoble à vignoble en favorisant le transport du nématode (CARLES, 1985 ; GUGERLI et al. , 1990).

---

**Tableau 04: Néovirus infectant la vigne: court noué (dégénérescence et dépérissement) (WALTER et al, 2000)**

VIRUS	NEMATODES VECTEURS	LOCALISATION
<b>DEGENERESCENCE</b>		
Artichoke Italian latent (AILV)	<i>L. apulus</i>	Bulgarie
Arabis mosaic (ArMV)	<i>L. fasciatus</i> <i>X. diversicaudatum</i>	Allemagne, Bulgarie, Croatie, France, Hongrie, Israël, Italie, Japon, Serbie, Suisse, Turquie, Ukraine, USA
Blue berry leaf mottle (BBLMV)	Inconnu	USA
Grapevine Bulgarian latent (GBLV)	Inconnu	Bulgarie, Croatie, Hongrie, Portugal
Grapevine chrome mosaic (GCMV)	Inconnu	Autriche, Croatie, Hongrie, Tchécoslovaquie
Grapevine fanleaf (GFLV)	<i>X. index</i>	Monde
Raspberry ringspot (RRV)	<i>L. macrosoma</i> <i>L. elongatus</i> <i>P. maximus</i>	Allemagne, Suisse
Strawberry latent ringspot (SLRSV)	<i>X. diversicaudatum</i> <i>L. attenuatus</i>	Allemagne, Italie, Portugal, Tchécoslovaquie, Turquie
Tomato black ring (TBRV)	<i>L. elongatus</i>	Allemagne, Canada, Croatie, France, Grèce, Hongrie, Israël
<b>DEPERISSEMENT</b>		
Peach rosette mosaic (PRMV)	<i>X. americanum</i> <i>L. diadecturus</i> <i>L. elongatus</i>	Canada, USA
Tomato ringspot (ToRSV)	<i>X. californicum</i> <i>X. rivesi</i>	Canada, USA
Tobacco ringspot (TRSV)	<i>X. americanum</i>	Canada, USA

*L.* = *Longidorus*; *P.* = *Paralongidorus* ; *X.* = *Xiphinema*

### 3.1.3/ Les effets de la maladie sur les cultures

D'après MARTELLI (1992) et GALET (1995), Le court-noué détermine des effets négatifs sur la vigne :

- production réduite en quantité et en qualité
- moindre endurance aux conditions climatiques
- raccourcissement de la vie productive des vignobles
- dépérissement progressif et mort des ceps.

De plus, le court-noué peut modifier certains processus physiologiques ; en effet la réduction de la surface foliaire due à la présence du virus provoque des perturbations au niveau de la photosynthèse (diminution de la teneur en chlorophylle) et de l'intensité respiratoire (WALTER, 1988).

## 3.2/ Virus de l'enroulement foliaire (GLRaV)

### 3.2.1/ Symptômes

L'enroulement foliaire est l'une des plus importantes maladies à virus de la vigne. Il est largement répandu dans tous les pays viticoles du monde. Toutes les variétés de vigne à fruit ainsi que les portes-greffes peuvent être infectés. Mais les symptômes sont surtout visibles sur les cépages rouges de *Vitis vinifera* (BOVEY et al. , 1980).

Les symptômes de l'enroulement foliaire se manifestent d'abord au niveau des feuilles de la partie inférieure des sarments par des taches rougeâtres pour les cépages rouges et par des taches jaunâtres pour les cépages blancs (BOVEY et al. , 1974 ; CRESPIY,1992 ; WALTER et al, 1996).

La décoloration est internervaire puis s'étend progressivement à toute la surface du limbe excepté les nervures principales qui restent vertes (BOVEY et al. , 1980). Les feuilles des ceps attaqués s'épaississent, deviennent cassantes et s'enroulent vers la face inférieure (OUERFELLI, 1989).

Selon GUGERLI et al (1990), sur les variétés de porte-greffes, les virus de l'enroulement ne produisent généralement aucun symptôme. De ce fait, les risques de dissémination à partir des porte-greffes sont élevés.

Au niveau interne, les observations cytologiques des coupes ultrafines des sarments de vigne infectée par la maladie, montrent la dégénérescence des cellules de phloème avec l'occlusion des éléments conducteurs et nécrose des cellules compagnes et parenchymateuses (ROSCIGLIONE et al., 1983).

### 3.2.2/ Agent causal et mode de transmission du virus de l'enroulement foliaire

La propagation de l'enroulement foliaire dans le vignoble est le fait de l'intervention de l'homme par l'emploi incontrôlé du matériel de multiplication (greffons et portes-greffes infectés), ainsi que par la plantation de jeunes pieds contaminés (BRUGNON et BESSIS, 1968).

---

D'après GAUTIER (1993) et BOSCIA et al. (1995), l'enroulement peut être induit par un complexe du virus dont la majorité appartient au groupe des closterovirus. Selon MARTELLI (1994), les cinq types de particules virales (GLRaV I, GLRaV II, GLRaV III, GLRaV IV et GLRaV V) sont transmis de manière efficace d'une vigne à l'autre par deux cochenilles : *Planococcus ficus* et *Pseudococcus longispinus*. Des études plus récentes confirment la présence de huit closterovirus qui ont été décrits en association avec les symptômes d'enroulement (Tableau 05) (WALTER et al., 2000).

**Tableau 05: Les vecteurs des virus liés à l'enroulement (WALTER et al., 2000)**

VIRUS	COCHENILLES VECTRICES
Grapevine leafroll associated-1 (GLRaV-1)	<i>Heliococcus bohemicus</i> , <i>Neopulvinaria innumerabilis</i> , <i>Parthenolecanium corni</i> , <i>Phenanococcus aceris</i> .
Grapevine leafroll associated-2 (GLRaV-2)	<i>Pseudococcus affinis</i> , <i>Pseudococcus longispinus</i>
Grapevine leafroll associated-3 (GLRaV-3)	<i>Phenanococcus aceris</i> , <i>Planococcus citri</i> , <i>Planococcus ficus</i> , <i>Pseudococcus affinis</i> , <i>Pseudococcus calcéolaria</i> , <i>Pseudococcus longispinus</i> , <i>Pseudococcus maritimus</i> , <i>Pulvinaria vitis</i>
Grapevine leafroll associated - 4 à 8 (GLRaV - 4 à 8)	<i>inconnues</i>

### 3.2.3/ Les effets de la maladie sur les cultures

Les raisins des ceps infectés par l'enroulement foliaire mûrissent tardivement et de façon irrégulière. Le retard a pu être estimé de deux à trois semaines (GUGERLI et al. , 1990 ; ROBBE-DURAND et al. , 1990).

La présence de l'enroulement foliaire se traduit très souvent par une diminution simultanée de la quantité de raisin produit et de la teneur en sucre (VUITTENEZ, 1984 ; MARTELLI, 1995 ; GUGERLI et al., 1997).

En outre, le virus de l'enroulement diminue le taux de reprise au greffage et l'enracinement des plants (BOVEY et al. , 1974)

## 3.3/ La marbrure ou Fleck

### 3.3.1/ Symptômes

Cette virose est largement répandue à l'état latent sur tous les cultivars européens et les portes-greffes américains, sauf sur *Vitis rupestris* et en particulier du lot ou Saint Georges (BOVEY et al., 1980).

Les symptômes de la maladie sont observés pendant toute la période végétative chez les jeunes feuilles du *rupestris* du lot (ABRACHEVA, 1992).

Ils se manifestent par un éclaircissement des nervures, avec un enroulement du limbe vers la face supérieure et parfois d'importantes déformations foliaires (BOVEY et al., 1980 ; WALTER et al, 1996).

### 3.3.2/ Agent causal et mode de transmission

La dissémination considérable du virus est probablement due au fait qu'il ne produit pas de symptômes chez les *Vitis vinifera* (BOVEY et al., 1980).

D'après BOSCIA et al (1991), l'agent infectieux causal est le grapevine fleck virus (GFKV), un virus à particules isométriques de 30 nm de diamètre, limité au phloème ; ce virus n'est pas transmissible mécaniquement.

Le GFKV a des propriétés qui le rapprochent des virus des genres *Tymovirus* et *Marafivirus*, mais il a été proposé récemment de créer un nouveau genre dont le GFKV serait l'espèce type et qui pourrait comprendre deux autres virus proches du GFKV décrits sur vigne en suisse et au Japon, le GAMaV (Grapevine asteroid – associated virus) et le GRGV (Grapevine red globe virus) (WALTER et al., 2000).

### 3.3.3/ Effet de la maladie sur les cultures

La marbrure reste latente sur la quasi-totalité des cépages de *Vitis vinifera*, cependant sur *Vitis rupestris*, elle induit une diminution de la rhizogénèse et la reprise au greffage (WALTER et al., 2000). Selon le même auteur, l'infection simultanée par la marbrure et l'enroulement peut avoir un effet dépressif très important.

---

## 1/ METHODES DE DIAGNOSTIC

Le diagnostic des maladies virales fait appel à une série de techniques conduisant à l'identification du virus (WALTER, 1988; SEMAL, 1993)

- Description des symptômes observés au niveau du vignoble.
- Transmission des maladies à des plantes tests (herbacées et ligneuses).
- Sérologie associée à la microscopie électronique.
- L'électrophorèse et l'hybridation moléculaire.

### 1.1/ Détection par symptomatologie au champ

L'observation précise des symptômes chez la plante hôte constitue la première étape du diagnostic. Cependant, la symptomatologie directe ne peut être considérée comme une méthode générale de diagnostic car elle présente plusieurs insuffisances. Le plus souvent elle se heurte à deux difficultés principales (SPIRE, 1988) :

- d'une part la latence de plusieurs virus sur certaines variétés de vigne qui échappent aux inspections visuelles (GALET, 1977).
- d'autre part, une bonne connaissance est exigée pour les symptômes causés par les agents pathogènes, par les carences, par les ravageurs et anomalies qui peuvent être confondus avec ceux des maladies à virus (BOVEY et al., 1980 ; LEPOIVRE et KUMMERT, 1993).

### 1.2/ Détection par indexage

L'indexage consiste à transmettre les virus par inoculation mécanique ou par greffage sur une plante particulièrement sensible choisie pour sa capacité à extérioriser rapidement les symptômes d'une virose donnée, cette plante est dite : Indicateur ou plante test (BOVEY et al., 1974 ; GILES et VERHOYEN, 1992 ; AUBERT et VULLIN, 1997).

#### 1.2.1/ l'inoculation mécanique sur indicateurs herbacés

C'est une technique mise au point par CADMAN, DIAS et HARISSON en 1960, qui ont montré qu'il est très facile de transmettre le virus du court-noué (GFLV) à des plantes herbacées, alors qu'auparavant, le virus était réputé intransmissible en dehors du genre *Vitis* (GALET, 1995).

L'utilisation des plantes indicatrices herbacées est très avantageuse vu qu'elles sont très faciles à cultiver sous les conditions de milieu contrôlées. De plus elles se distinguent par une croissance et une extériorisation des symptômes très rapides (durée maximale 15 à 20 jours) (CORNUET, 1987 ; CLOQUEMIN, 1988; HANIM, 1991). Selon GALET (1995), l'observation des symptômes commence à partir du sixième jour jusqu'aux dixième jour de l'inoculation pour le court-noué.

---

Les plantes herbacées les plus utilisées pour la détection des virus de la vigne sont les Chenopodiaceae (*Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*); les Solanaceae (*Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* L); les Amaranthaceae (*Gomphrena globosa*) et les Cucurbitaceae (*Cucumis sativus* L) (BOVEY, 1981; MORSLI, 1995); les Légumineuses (*Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba*) (LAGHA, 1990).

### 1.2.2/ L'indexage par greffage sur indicateurs ligneux

C'est une technique utilisable surtout pour les virus latents et pour les virus qui ne se transmettent pas mécaniquement (BOVEY, 1981).

La détection est basée sur les symptômes produits soit sur la variété elle-même, soit sur une autre variété ou espèce sensible de *Vitis*; l'efficacité de l'indexage implique le choix de variétés indicatrices adéquates, réagissant à chaque type de virose par des symptômes caractéristiques (BOVEY et al., 1980).

Ainsi, la maladie de la marbrure non repérable chez *Vitis vinifera* et de nombreux portes-greffes, se révèle chez les variétés indicatrices appropriées *Vitis rupestris* du lot et *rupestris berlandieri* 99R, De même la nécrose des nervures chez *Rupestris berlandieri* 110R et l'écorce liégeuse sur LN 33 (BOVEY et al, 1980).

Plusieurs variétés de vigne sont utilisées comme indicatrices du fait de leur sensibilité à tel ou tel virus (tableau 06) (MARTELLI, 1985) :

**Tableau 06: Indicateurs ligneux utilisés pour l'indexage des maladies virales de la vigne (MARTELLI, 1985)**

VARIETES INDICATRICES	MALADIES
<i>Vitis rupestris</i> Saint George <i>Vitis vinifera</i> Mission 110 R ( <i>Vitis rupestris</i> x <i>Vitis berlandieri</i> ) Kobber 5BB ( <i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis riparia</i> ) LN 33 ( <i>Couderc</i> 1613 x <i>Vitis vinifera</i> )	Court-noué, Marbrure Enroulement foliaire Nécrose des nervures Enation, Bois strié Bois strié, Ecorce liégeuse

La lecture des résultats sur indicateurs ligneux demande un délai plus long que pour les indicateurs herbacés. Ce délai peut aller de deux semaines à deux mois pour les virus du court noué et de la marbrure, mais peut nécessiter une année pour l'enroulement foliaire et le bois strié (MARTELLI, 1985; WALTER, 1998).

Cette durée de réponse très longue met en évidence l'intérêt de réduire la durée de l'apparition des symptômes par de nouvelles méthodes: le greffage en vert et l'indexage in vitro par le microgreffage de tige.

### 1.2.3/ Le greffage en vert

Actuellement, la détection rapide des maladies à virus de la vigne est établie par une nouvelle technique de greffage en vert ; des boutures vertes des variétés à tester sont greffées sur des boutures vertes du porte greffe (plante indicatrice) ; Les assemblages sont maintenus à des conditions contrôlées d'humidité et de température élevées. Les greffes sont ensuite transférées en serre pour l'extériorisation des symptômes qui aura lieu après quatre à douze semaines selon la maladie (WALTER et al. , 1990 ; MARTIN et COLLAS, 1992).

### 1.2.4/ L'indexage par microgreffage de tige *in vitro*

Cette méthode consiste à multiplier *in vitro* des microboutures herbacées de plantes indicatrices et de plants candidats ; le microgreffage est effectué selon la technique de la fente pleine (TANNE et al., 1996).

Des travaux réalisés par HASSANI et BOUBALS (1991) et D'KHILI et al. (1995) sur la manifestation des symptômes du virus de la nécrose des nervures par microgreffage *in vitro* du 110 Richter sur des variétés de *Vitis vinifera* ont permis de déceler des symptômes de dépérissement, des nécroses foliaires et des taches noires sur les tiges et les racines environ 40 à 50 jours après leur mise en culture.

D'autres travaux de TANNE et al.(1993) de détection du virus du bois strié par microgreffage de variétés de vigne sur LN33 ont révélé les symptômes du bois strié 8 à 12 semaines après le microgreffage.

## 1.3/ Détection par la sérologie

Les méthodes sérologiques sont la base des tests de dépistage direct des vignes infectées, applicables au contrôle sanitaire des clones de vigne en cours de sélection. Les tests sérologiques présentent sur les autres techniques de diagnostic l'avantage décisif d'être réalisables toute l'année, en utilisant des extraits de feuilles préparés lorsque les vignes sont riches en virus au printemps. Ces extraits peuvent être stockées au congélateur sans perdre leur pouvoir de réaction pendant une période prolongée (VUITTENEZ, 1974).

Les méthodes sérologiques sont basées sur les propriétés de deux types de molécules possédant une affinité l'une pour l'autre : l'antigène, partie protéique propre au virus, et l'anticorps, spécifique de l'antigène élaboré par un animal auquel cet antigène a été injecté (HILL, 1984 ; LEPOIVRE et KUMMERT, 1993).

### 1.3.1/ Le test Elisa

La méthode Elisa (Enzyme linked immuno-sorbent assay), comme son nom l'indique, fait appel à une réaction immuno- enzymatique où la formation du complexe antigène-anticorps est accompagnée et mise en évidence par une réaction enzymatique (CLARK et ADAMS, 1977).

---

Cette méthode a permis de déceler plusieurs virus dans des vignes apparemment saines. Elle s'impose comme une méthode de choix pour la détection et l'identification de toutes les viroses dans le cas de la sélection de la vigne (BOUQUET et DANGLOT., 1983 ; GUGERLI et al., 1984, WALTER et DEMANGEAT., 1994).

D'après WALTER et al (1984) ; LEPOIVRE et KUMMERT, (1993), cette méthode est très pratique, rapide (réponse après 48 heures). Elle permet l'analyse d'un nombre élevé d'échantillons et la détection de très faibles concentrations en virus ( $1\text{ng.ml}^{-1}$  à  $10\text{ng.ml}^{-1}$ ).

De plus, c'est une technique très fiable et précise du fait que les virus sont identifiés spécifiquement par chaque sérum (CORBAZ, 1990 ; FUCHS et WALTER, 1990).

### **1.3.2/ Détection par la technique d'immuno-électromicroscopie (IEM)**

La combinaison des techniques sérologiques et la microscopie électronique s'est avéré particulièrement efficace pour la détection des virus (ROSCIGLIONE et al ., 1986).

En microscopie électronique, la sensibilisation des grilles par des anticorps spécifiques permet de retenir les particules virales présentées dans un extrait végétal et observer le précipité formé (GUGERLI et al., 1984 ; ZIMMERMANN et al., 1988 ; FOX ,1993).

### **1.4/ Détection par électrophorèse :**

Cette technique se développe particulièrement pour les viroïdes qui ne peuvent pas être détectés par la sérologie (LAGHA, 1990).

En plus de sa large diffusion dans le domaine de la purification des virus, son application dans le diagnostic a permis la possibilité de révéler l'infection mixte par des virus ou des viroïdes (ABOU GHANEM, 1993).

L'électrophorèse permet la migration des molécules chargées selon leur taille, leur forme et leur structure tridimensionnelle. Le choix du gel (polyacrylamide, agarose ou agar) joue un rôle primordial dans la séparation des composantes virales suivant leur poids moléculaire (OUERFELLI, 1990 ; LAGHA, 1990).

### **1.5/ Détection basée sur l'hybridation des acides nucléiques (PCR)**

Le développement des techniques moléculaires a permis de progresser sans cesse dans la caractérisation de nouveaux agents pathogènes et la mise au point de nouveaux tests de diagnostic (GENTIT, 2002).

Les techniques moléculaires par PCR permettent de répondre à une demande de diagnostic fiable et rapide, en absence de tests biologiques précis basés sur l'épidémiologie. Elles permettent d'établir un bilan sanitaire qui fait la distinction entre les souches de virus sur la base de leurs propriétés moléculaires à l'aide d'amorces spécifiques des souches virales suivi d'une digestion du produit amplifié par des enzymes de restriction ( GENTIT, 2002).

---

Le recours à l'amplification moléculaire permet le séquençage des acides nucléiques d'un pathogène et confère également de nouvelles perspectives de compréhension des interactions hôte/parasite et l'identification des facteurs de virulence (FUCHS et al., 1991).

Chez la vigne, cette technique a permis de détecter plusieurs virus en un seul test en utilisant plusieurs couples d'amorces spécifiques ; c'est ainsi, des amorces dégénérées qui amplifient une région génomique conservée permettant de détecter plusieurs clostérovirus et vitivirus simultanément (MINAFRA et al., 1994 ; WALTER, 1998).

## **2/ METHODES DE LUTTE**

Les virus sont à l'origine d'une diminution considérable de la quantité et de la qualité des récoltes ; de ce fait, il est nécessaire d'utiliser des stratégies de lutte différentes de celles qui sont pratiquées contre les champignons ou les bactéries (RIVES, 1971 ; WALTER, 1996).

En effet, les virus utilisent pour se multiplier la machinerie cellulaire de la vigne qu'ils infectent et qu'ils détournent à leur profit. Ainsi les maladies virales échappent à la lutte chimique, dont l'action perturberait aussi le métabolisme des cellules végétales (VIDAUD et al, 1993 ; WALTER, 1996).

### **2.1/ Sélection sanitaire**

L'objectif de la sélection sanitaire est le choix des ceps non infectés par les virus les plus néfastes (virus du court noué, de l'enroulement foliaire pour les variétés de vigne et le virus de la marbrure pour les porte-greffes) et la multiplication de leurs descendances clonales maintenues le plus longtemps possible à l'abri des contaminations virales (RIVES, 1971 ; VIDAUD et al, 1993 ; WALTER et al., 2000).

La sélection sanitaire repose sur la sélection clonale qui a pour but de sélectionner et de propager pour un cépage donné les clones les mieux adaptés aux contraintes qualitatives et productives (RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD, 1971 ; WALTER et MARTELLI, 1996).

Selon WALTER et al. (2000), les étapes successives de la sélection clonale sont les suivantes :

- détection des ceps intéressants appelés « têtes de clone »
- analyse sanitaire et génétique de chaque clone
- expérimentation des clones certifiés
- conservation et multiplication des clones.

## 2.2/ La lutte contre les vecteurs de virus

### 2.2.1/ la lutte contre les nématodes

La lutte contre les nématodes, vecteurs des virus du court noué est menée aujourd'hui par le repos du sol et par la désinfection chimique (SEMAL et VANDERVEKEN, 1993).

Le repos du sol consiste à interrompre dans la parcelle la culture des espèces végétales hôtes des espèces de nématodes vecteurs. Les hôtes principaux de *Xiphinema index* sont en plus de la vigne : le figuier, le jasmin, le peuplier...etc. et pour *Xiphinema diversicaudatum* ce sont : le fraisier, le framboisier, le rosier, le pêcher, le cerisier...etc.(WALTER et al.,2000).

Après une période de 5 à 7 ans de repos, les nématodes tendent à disparaître de la parcelle (SEMAL et VANDERVEKEN, 1993).Cependant, la désinfection du sol ne permet pas d'éradiquer les nématodes, mais de retarder plus ou moins l'apparition des symptômes viraux dans la parcelle (WALTER et al., 2000).

D'autant plus que, la désinfection à l'aide de nématocides n'est pas toujours efficace et surtout comporte des risques non négligeables de contamination des eaux souterraines (BOUQUET, 1983 ; MAUROS et al, 1994 ; WALTER, 1996).

### 2.2.2/ La lutte contre les cochenilles

La lutte contre les cochenilles nécessite une stratégie à base de traitement insecticide. Cependant cette méthode n'est pas toujours efficace contre les vecteurs aériens qui jouent un rôle significatif dans la dissémination des virus (SEMAL et VANDERVEKEN, 1993).

En outre, des connaissances complémentaires sur la nature des espèces vectrices, sur leur biologie, sur l'existence d'ennemis naturels, parasites ou prédateurs de ces espèces et sur les situations climatiques dans lesquelles les insectes vecteurs n'existent pas, permet d'envisager des méthodes de lutte plus efficaces (WALTER et al., 2000).

## 2.3/ La prémunition

La prémunition ou protection croisée repose sur l'utilisation d'isolats hypo-virulents d'un phytovirus qui, en infectant une plante, induisent chez celle ci une protection vis à vis d'une surinfection par des isolats hyper-virulents du même virus (CORBAZ, 1990 ; DUNEZ, 1996)

La prémunition a été utilisée en pratique à grande échelle contre les virus de la tomate, des citrus et du papayer (LEPOIVRE et SEMAL, 1993).

Cette stratégie a été expérimentée pour la lutte contre les virus du court noué. Dans ce cadre des isolats hypo-virulents d'ArMV et de GFLV ont été démontrés d'abord sur un hôte herbacé : *Chenopodium quinoa* (DUNEZ, 1990 ; WALTER et al., 2000).

Des essais effectués sur des vignes atteintes de court noué ont montré que certains isolats hypo-virulents peuvent induire un retard à l'infection par un isolat hyper-virulent. Ceci se traduit par une atténuation des symptômes et un accroissement de la récolte de raisin par comparaison avec des ceps non prémunis infectés par le même isolat hyper-virulent (WALTER, 1998 ; WALTER et al., 2000).

---

## 2.4 /La recherche de porte-greffes résistants

L'utilisation de porte-greffes résistants à la transmission du virus du court noué apporterait une garantie supplémentaire contre les risques de recontamination (BOUBALS, 2001 ; GUGERLI et al, 1990).

Selon GALET (1977), les porte-greffes paraissant résistants ou tolérants étaient en réalité des variétés peu multipliées : (333 EM, 44-53 M, 196-17 CL, GL...etc.), mais possédant par conséquent un état sanitaire moyen supérieur aux variétés fortement diffusées tels que : *Riparia gloire*, *Rupestris du lot*, 3309 C...etc.

En matière de résistance au court noué, les recherches se sont orientées vers la sélection des porte-greffes possédant une bonne résistance ou une bonne tolérance à *Xiphinema index*, notamment par le recours à des espèces telles que *Vitis aizonica* ou *Vitis rufotomentosa* (BOUQUET, 1983 ; BOUQUET et DANGLLOT., 1983).

En 1978, BOUBALS et PISTRE ont montré que l'immunité stricte à *Xiphinema index* n'existait pas dans le genre *Vitis*, ni d'ailleurs dans les genres *Parthenocissus* et *Ampelopsis* ; ils ont également noté que des plants de muscadine inoculés par le virus au moyen de *Xiphinema index* infectieux, ne manifestaient cinq ans après, aucun symptôme foliaire de court noué à la différence de toutes les espèces du genre *vitis* et des porte-greffes inoculés dans les mêmes conditions.

Cependant selon BOUQUET (1978 ;1981) ; BOUQUET et al (2000), il est apparu que l'espèce *Muscadinia rotundifolia* cultivée dans le sud-est des Etats unis, et connue depuis longtemps pour sa résistance totale aux *Phylloxéra*, possédait également un degré très élevé de résistance à *Xiphinema index*.

## 2.5/ Résistance induite par transfert de gènes

Les recherches pour la création de porte-greffes résistants aux court noué ont été entreprises, il' y a une vingtaine d'année. Les premières expérimentations de transgénèse sur la vigne se développent dans différents laboratoires à travers le monde dans le but d'ajouter aux porte-greffes et aux cépages un caractère nouveau, sans modifier leurs autres propriétés (MAUROS et al, 1994 ; WALTER, 1996).

Dans cette optique, les chercheurs ont eu recours à la transgénèse, avec utilisation de la stratégie dite « anti-sens » ou « résistance dérivée du pathogène », qui consiste à insérer dans le génome de la plante une copie inverse du gène qui code pour la protéine constituant la capsid du virus (RIBA, 2001).

En Autriche, en France, en Israël, en Suisse et aux Etats Unis d'Amérique, la stratégie de la « résistance dérivée du pathogène » est en cours d'expérimentation sur la vigne (WALTER et al., 2000).

Ainsi, les gènes de la coque protéique de népovirus (ArMV, GFLV, GCMV) ont été transférés dans divers cépages de *Vitis vinifera* et de porte-greffes. De même pour les virus GVA, GVB et G GLRaV-3 (WALTER et al., 2000).

## 1/ INTRODUCTION

La multiplication *in vitro* est un mode de reproduction asexuée (reproduction végétative artificielle) (BOCCON-GIBBOD, 1989), qui s'applique autant à des plantes entières qu'à des fragments de plantes (tissus ou organe) et aussi bien à des cellules isolées (AUGE, 1989).

La culture *in vitro* représente un outil puissant aux perspectives industrielles et économiques importantes. De même diverses techniques dérivées de la culture *in vitro* ont un rôle important à jouer pour l'amélioration des performances agronomiques ou horticoles des plantes cultivées (RAJNCHAPEL et GUERCHE, 1985).

C'est dans le concept de totipotence cellulaire que la culture *in vitro* doit toute son extension. Selon HABERLANDT (1902), toute cellule végétale vivante qu'elle que soit sa spécialisation, du moment qu'elle est vivante et possède un noyau, est capable de reproduire la plante entière d'où elle provient.

En général, au cours du développement de l'embryon puis de la plante, les cellules provenant des divisions successives se différencient en se spécialisant, alors que les cellules des organes adultes cessent de se diviser. Mais chez les végétaux il persiste toujours des méristèmes qui confère à la plante une organogenèse permanente ou indéfinie qui l'oppose à l'ontogenèse des animaux, laquelle est définie par la mise en place des organes que pendant la seule vie embryonnaire (MARGARA, 1989; HELLER et al., 1995).

## 2/ HISTORIQUE

Les premiers travaux de la culture *in vitro* de tissus végétaux sont dus à HABERLANDT (1902), qui énonce le concept de la totipotence cellulaire. Ainsi, il réussit à faire survivre *in vitro* pendant quelques mois mais sans multiplication, de petits amas cellulaires issus de cellules isolées de tissus palissadiques de feuilles de *Lamium purpureum*.

Il a fallu attendre 1922, pour que de nouveaux espoirs apparaissent pour la culture de tissus végétaux, grâce à ROBBINS, qui réussit à maintenir des pointes de racines en survie près de six mois et à obtenir des fragments qui passèrent de quelques millimètres à six centimètres de long.

En 1934, WHITE réussit une culture indéfinie de racines de tomate. Ce succès fut sans doute à l'origine des résultats obtenus par GAUTHERET (1939), qui réussit les premières cultures indéfinies de tissus de carotte.

En 1944, BUVAT par les techniques de culture de tissus du tabac, met en évidence le phénomène de dédifférenciation qui aboutit à une structure cytologique comparable à celle des cellules des méristèmes.

En 1946, BALL obtient la régénération de plants de lupin à partir d'apex de grande taille.

En 1957, SKOOG et MULLER régénèrent des racines et des tiges de tabac à partir de cals sous l'influence d'auxines et de cytokinines.

---

Une autre étape historique a été la guérison de plantes atteintes de maladies à virus à l'aide de la culture *in vitro* de méristèmes ; en effet, les observations qui ont conduit à la mise au point de cette technique ont débuté avec les travaux de WHITE en 1932, qui a remarqué que dans les racines de tomates cultivées *in vitro* et provenant de plantes infectées par le virus de la mosaïque du tabac, le nombre de particules virales diminue régulièrement des extrémités des racines (BOXUS, 1978).

En 1949, LIMASSET et CORNUET ont montré le même phénomène dans les méristèmes de tabac virosé.

En 1952, mettant à profit ces travaux, MOREL et MARTIN régénèrent des plantes entières saines de dahlia à partir de culture de méristèmes de plants infectés par deux virus : la mosaïque et le spotted wilt virus.

Deux ans plus tard, la même méthode permit de sauver la variété de pomme de terre « la belle de Fontenay » atteintes des virus A, Y et X (BOXUS, 1978 ; RAJNCHAPPEL-MESSAI et GUERCHE, 1985).

Depuis lors, la culture de méristème a permis la régénération d'un grand nombre d'espèces (la vigne, le framboisier...etc.) et l'élimination de beaucoup de viroses (BOXUS, 1978 ; REGNER ET AL., 1995).

### **3/ TECHNIQUES DE MULTIPLICATION PAR CULTURE IN VITRO**

La culture *in vitro* d'explants ou de fragments prélevés sur la plante permet différentes applications :

#### **3.1/ La micropropagation**

La multiplication végétative *in vitro* ou micropropagation est une technique en plein essor. Elle consiste à reproduire des plantes semblables à la plante mère à partir d'un fragment plus ou moins grand (AUGE et BOCCON-GIBBOD, 1989).

La micropropagation *in vitro* peut suivre deux voix différentes (ZRYD et al., 1988 ; REYNIER, 1991) :

##### **3.1.1/ Multiplication par bourgeonnement axillaire**

En provoquant le débourrement des bourgeons axillaires présents naturellement à l'aisselle des feuilles ; un bourgeon de tige mis en culture ne développe en principe qu'un seul axe par la croissance du méristème caulinaire principal, cette technique de micropropagation fait donc accélérer le fonctionnement normal des méristèmes des bourgeons déjà formés sur une plante.

Le même développement végétatif peut être provoqué à partir de fragments de tiges ou d'inflorescences qui comportent des nœuds et par conséquent des bourgeons axillaires.

##### **3.1.2/ Multiplication par bourgeonnement adventif**

En provoquant l'apparition de bourgeons adventifs en des endroits inhabituels, l'initiation de méristèmes peut être en principe induite sur n'importe quel type d'organes ou de tissus, y compris sur ceux qui ne les produisent pas dans les conditions naturelles.

---

Le bourgeonnement adventif favorise soit une organogenèse directe qui permet d'obtenir des pousses adventives en grand nombre directement sur les tissus mis en culture sans le passage par le stade cal ; soit une organogenèse indirecte, qui nécessite le passage par le stade cal, le plus souvent utilisée pour l'obtention de variation somaclonale.

### 3.2/ L'embryogenèse somatique

L'embryon est défini comme étant une plante à son stade initial de développement. Il s'agit en fait d'une structure bipolaire où s'individualisent rapidement et simultanément deux méristèmes, l'un rhizogène, l'autre caulinaire, qui suite au processus de germination donne naissance à une nouvelle plante (MARGARA, 1989). L'embryon zygotique est un embryon issu de la fécondation de l'oosphère et du spermatozoïde.

En culture *in vitro*, il est possible par des modifications de l'équilibre hormonal ou physico-chimique d'induire l'expression d'un programme génétique différent qui permet à une cellule de se diviser et de se différencier en cellules embryonnaires qui peuvent être source de tissus ou cals embryogènes, qui produisent des embryons dits embryons somatiques (GOACOLOU et PERDRIZET, 1988).

L'embryon somatique est un embryon issu du développement *in vitro* d'une cellule somatique à 2n chromosomes.

L'intérêt essentiel des recherches sur l'embryon somatique a été de montrer que la capacité de reproduire un nouvel individu est une aptitude fondamentale de la cellule végétale (totipotence cellulaire) (ZRYD et al., 1988 ; MARGARA, 1989).

### 3.3/ La culture de méristèmes

La culture de méristèmes constitue une autre application importante de la culture *in vitro*, notamment pour l'éradication des maladies à virus (MARTIN, 1985 ; REGNER et al., 1995).

Les méristèmes sont formés de cellules non différenciées à l'origine de tous les tissus de la plante. Leur mise en culture *in vitro* permet d'obtenir une plante identique à la plante initiale ; l'intérêt des méristèmes réside dans le fait que ce sont des structures indemnes de virus capables de donner des plantes saines (HELLER et al., 1995).

#### 3.3.1/ Problèmes posés par la culture de méristèmes

##### ✓ La taille de l'explant

Il est généralement admis que le taux d'assainissement est lié à la taille du méristème prélevé. Plus le méristème est petit plus le taux de réussite est élevé (BOXUS, 1978). Cependant chez de nombreuses espèces l'obtention directe d'une plante à partir du dôme apical reste très aléatoire ; ainsi, chez le fraisier le pourcentage de reprise est nul pour des méristèmes de 0.1mm, et il est égal à 10 % lorsque leur hauteur est de 0.2 mm (ZRYD et al., 1988).

---

En effet, le méristème étant très petit peut se dessécher, par contre le prélèvement des méristèmes comportant plus de deux primordia foliaires peut entraîner des cellules sous jacentes virosées (AUGE et BOCCON-GIBBOD, 1989).

#### ✓ **L'état physiologique du pied mère**

Chez les espèces herbacées, lorsque les méristèmes sont prélevés sur des axes en croissance active, le taux de régénération ou de guérison atteint 80 à 90 % de l'effectif, par contre ce taux peut descendre à 5 ou 10 % quand le prélèvement se fait sur des rameaux en état de dormance (AUGE et BOCCON-GIBBOD, 1989).

Chez les espèces ligneuses, la reprise des méristèmes est d'autant plus difficile que l'arbre est âgé, les méristèmes excisés brunissent rapidement dans le milieu et meurent (ZRYD et al., 1988).

#### ✓ **Brunissement des tissus**

Il est à l'origine de l'oxydation des composés polyphénoliques excrétés par les explants. Ces composés ainsi que les produits de leur oxydation sont connus pour inhiber les activités enzymatiques des polyphénoloxydases, ce qui a pour effet d'entraîner la mort des méristèmes (ZRYD et al., 1988).

### **4/ LES CONDITIONS DE CULTURE DES TISSUS IN VITRO**

La technique *in vitro* est un mode de multiplication végétative artificielle des plantes. Il s'agit d'un ensemble de méthodes faisant intervenir des conditions de culture parfaitement contrôlées (milieux de culture définis pour chaque type de plante, lumière, température, humidité,...).

#### **4.1/ Le milieu de culture**

Les milieux de culture sont adaptés aux exigences de la plante. Ils contiennent en général de l'eau, des éléments minéraux, des éléments organiques, des régulateurs de croissance et des vitamines.

##### **4.1.1/ Les éléments minéraux**

- ✓ **Les macro-éléments :** Il s'agit de 6 éléments minéraux présents à des concentrations élevées tels que l'azote (N), le calcium (Ca), le potassium (K), le soufre (S), le magnésium (Mg) et le phosphore (P) (GAUTHERET, 1959)
  - ✓ **Les micro-éléments :** appelés aussi oligo-éléments, et bien qu'ils ne soient nécessaires à la plante qu'en faibles concentrations, leur rôle est essentiel pour l'équilibre nutritif de la culture ; les principaux d'entre eux sont le fer (Fe), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo), le bore (B), le chlore (Cl), le cobalt (Co) et le nickel (Ni) (GAUTHERET, 1959).
-

#### 4.1.2/ Les éléments organiques

- ✓ **Les sucres** : dans le cas des tissus végétaux placés en culture *in vitro*, l'assimilation chlorophyllienne est nulle ou insuffisante pour assurer la survie et le développement de l'explant ; dès lors, l'adjonction des sucres (le plus souvent du saccharose) dans le milieu de culture est nécessaire pour fournir à l'explant une source de carbone (GAUTHERET, 1959).
- ✓ **Les vitamines** : l'emploi de diverses vitamines favorise fréquemment le développement des cultures *in vitro*, elles appartiennent surtout au groupe B, les plus courantes sont : la vitamine B1 (thiamine-HCl), la vitamine B6 (la pyridoxine), la biotine, la pantothénate de calcium et le myo-inositol (GAUTHERET, 1959).

#### 4.1.3/ Les régulateurs de croissance

Appelés généralement hormones de croissance, ce sont des composés organiques synthétisés dans un organe et transportés vers des cellules cibles dans lesquelles ils déclenchent une réaction précise. Chez les végétaux on connaît actuellement 5 groupes d'hormones qui agissent principalement sur la division cellulaire (donc la croissance de la plante) et leur différenciation (la formation de divers organes) (HELLER et al., 1995).

L'effet des hormones dépend à la fois de leur concentration, de leur site d'action, du stade de développement de la plante.

##### ✓ **Les auxines**

L'auxine est un composé à noyau indole dont la formule brute est  $C_{10}H_9O_2N$ , dont le nom est Acide Indole B Acétique (AIA) ; la synthèse de l'auxine se situe au niveau des très jeunes feuilles, dans les bourgeons en activité, au niveau des ébauches florales et des jeunes fruits.

De nombreux composés de synthèse présentent des propriétés similaires à celles de l'auxine naturelle l'AIA : acide 2,4- dichlorophénoxyacétique (2,4-d), acide indole3 butyrique (AIB), acide1 naphthalène acétique (ANA).

Les auxines stimulent l'élongation des tiges, la différenciation et la croissance des racines, la maturation des fruits et l'abscission des feuilles et des fruits (ZRYD et al., 1988 ; AUGÉ, 1989 ; HELLER et al., 1995).

En culture *in vitro*, les auxines favorisent la croissance des cals, les divisions cellulaires, l'élongation cellulaire et favorisent l'enracinement des explants (ANONYME, 1999).

---

### ✓ Les cytokinines

Les cytokinines sont des adénines substituées dont la zéatine (Zéa) est naturelle ; élaborée essentiellement par les racines et au niveau des embryons.

D'autres cytokinines de synthèse sont utilisées: la kinétine (Kin), la 6-benzylaminopurine (BAP), la 2- isopentyl adénine (2IP). Elles sont synthétisées dans les tissus en croissance active plus particulièrement dans les racines, les embryons et les fruits.

Leurs principales propriétés physiologiques sont: la stimulation de la division cellulaire, la néoformation des bourgeons, l'inhibition de la dominance apicale et la levée de dormance de certaines semences (tabac, trèfle) et de certains bourgeons (vigne) (ZRYD et al., 1988 ; HELLER et al., 1995).

En culture *in vitro*, les cytokinines stimulent les divisions cellulaires, régularisent la morphogenèse (acquisition de la forme), stimulent la croissance des bourgeons axillaires et contribuent au renouvellement de la chlorophylle (ANONYME, 1999).

### ✓ Les gibbérellines

Les gibbérellines sont des hormones naturelles appartenant à la famille des diterpènes, qui comporte un noyau gibbérellane (cycle pentagonal flanqué de deux cycles hexagonaux).

Ces molécules sont produites dans les jeunes feuilles et les semences en développement, elles favorisent la germination des graines, lèvent la dormance des bourgeons, assurent l'élongation de la tige et la croissance des feuilles, stimulent la floraison et la fructification (ZRYD et al., 1988 ; HELLER et al., 1995).

En culture de tissus, seul l'acide gibbérellique A3 (GA3) est utilisé, il favorise le grandissement cellulaire, l'allongement des entre nœuds et lève la dormance des graines (ANONYME, 1999).

### ✓ L'acide abscissique (ABA)

Il est produit dans les bourgeons et est considéré comme un antagoniste des gibbérellines qui inhibent et retardent la croissance des rameaux dont les entre nœuds ne s'allongent pas. Il prolonge la dormance des bourgeons et des graines.

L'acide abscissique est une hormone de détresse qui permet à la plante de prendre des dispositions de défense à l'égard des agressions comme la sécheresse dont la fermeture des stomates et l'entrée en vie latente sont parmi les moyens mis en œuvre (HELLER et al., 1995).

En culture *in vitro*, bien qu'il soit un inhibiteur de croissance, il peut avoir un effet stimulant sur la croissance des cals (ZRYD et al., 1988).

### ✓ L'éthylène

C'est une hormone végétale sous forme gazeuse. Son dégagement est observé sur des graines en germination, sur des feuilles âgées, sur les fruits lors de leur maturation ; en effet elle agit sur la chute des feuilles et l'abscission des fruits (HELLER et al., 1995).

---

## 4.2/ Les facteurs physiques

### 4.2.1/ Les besoins en lumière

Les exigences en lumière des tissus cultivés *in vitro* sont moins importantes par rapport à celles des plantes entières autotrophes ; la photosynthèse n'est pas une activité nécessaire puisque l'énergie est fournie sous forme de sucre (BOCCON-GIBBOD, 1989) ; par ailleurs, la lumière est indispensable pour réguler certains processus morphogénétiques (ZRYD et al., 1988).

Dans la pratique, la plupart des salles de culture ont une durée d'éclairage de 16 à 18 heures par jour, les intensités lumineuses varient de 5 à 25 w.m<sup>-2</sup> (1000 à 5000 lux) (BOCCON-GIBBOD, 1989).

### 4.2.2/ L'influence de la température

La température des salles de culture est habituellement réglée de façon constante à 22-25°C. Les plantes à bulbes multipliées *in vitro* entrent en dormance après leur transfert en sol, si elles n'ont pas été préalablement soumises à une période de froid (2-5°C) pendant 4 à 6 semaines à l'obscurité (ZRYD et al., 1988).

## 5/ CULTURE DE TISSUS, PHYTOPATHOLOGIE ET ASSAINISSEMENT DE LA VIGNE

Les premières cultures *in vitro* de tissus de vigne furent établies par MOREL en 1944. Cependant, la culture *in vitro* en tant que méthode rapide de multiplication de la vigne fut mise au point par GALZY en 1961 ; depuis, plusieurs techniques ont été définies par plusieurs auteurs :

- le microbouturage (GALZY, 1969 ; NOZERAN et BANCILHON, 1972 ; MARTIN, 1985).
- embryogénèse somatique (MULLINS et SRINIVASAN, 1976).
- la néoformation caulinaire (FAVRE, 1977).
- la culture de fragment d'apex (BARLASS et SKENE, 1978).
- la micropropagation par bourgeonnement axillaire (HARIS et STEVENSON, 1982).
- la culture des feuilles (LEBRUN, 1985).
- la culture d'inflorescence (POOL, 1975).
- la culture d'anthères (ZOU et LI, 1981).
- la culture d'ovules (BESSIS et LABROCHE, 1985).
- la sélection sanitaire *in vitro* utilisée pour la production de matériel certifié: la culture de méristème associée ou non à la thérapie (GIFFORD et HEWITT, 1961 ; GALZY, 1966 ; BASS et VUITTENEZ, 1977), le microgreffage d'apex (AYUSO, 1985).

### 5.1/ La culture *in vitro* de méristèmes

La culture de méristèmes dans des milieux nutritifs a été entreprise par GALZY (1972) qui avait fait des recherches sur des milieux nutritifs plus favorables à la rhizogénèse de plants issus de méristèmes de *Vitis rupestris*.

---

En 1976, BINI suivant la même ligne de recherche a réussi à cultiver des méristèmes de *Vitis vinifera* avec des résultats encourageants.

BARLASS et SKENE, 1978 ont été les premiers à mettre au point une méthode simple et rapide permettant d'aboutir à la production industrielle de matériel de propagation de la vigne, à partir d'un seul méristème mesurant 1 mm et comportant deux à trois ébauches foliaires. Ils obtenaient un grand nombre de bourgeons adventifs.

### 5.2/ La thermothérapie

Le traitement par des températures élevées (37°C à 39°C) fut utilisé par KUNKEL en 1936 pour éliminer l'agent responsable du jaunissement du pêcher (CORNAGGIA, 1985). Lorsque des virus sont difficiles à éliminer par culture de méristèmes, il est possible d'améliorer les rendements en prélevant les méristèmes sur des plants qui ont subi préalablement la thermothérapie ; cette technique permet de prélever des explants plus gros tout en conservant un taux de guérison élevé (CORNAGGIA, 1985).

De nombreuses espèces ont été débarrassées des virus qu'elles renferment : pommes de terre, fraisiers, chrysanthèmes, œillets, arbres fruitiers, agrumes et vignes (GRENAN, 1980 ; DESVIGNES, 1990).

La thermothérapie de la vigne appliquée à des cultures *in vitro*, a été mise au point par GALZY (1963, 1966). Les premiers travaux ont essentiellement porté sur l'élimination du virus du court noué chez la variété *Rupestris* du lot ; Des plantes cultivées sur un milieu nutritif gélosé sont traitées pendant trois mois à 35°C dans une étuve éclairée 12 heures par jours, à la fin du traitement les boutures sont placées à 20°C pour être multipliées et transférées en serre.

Une autre technique recourt à la culture *in vitro* dans une étuve où les tubes à essais sont placés dans un bain-Marie qui assure une humidité proche de la saturation et surtout qui permet de maintenir l'ensemble de la plante à la température désirée (35°C) pendant toute la durée du traitement (MUR, 1979).

Cependant, la thermothérapie associée à la culture de méristèmes a permis d'assainir un grand nombre de clones de divers cépages infectés par différentes viroses (VALAT et al., 1979). Ainsi, la combinaison des deux techniques s'est avérée efficace contre le court noué (GIFFORD et HEWITT, 1961 ; MONETTE, 1986), l'enroulement foliaire (MUR, 1979 ; BALTHZARD, 1993), le bois strié (LEGIN et al., 1979) , la marbrure et la nécrose des nervures (MUR, 1979).

### 5.3/ Microgreffage d'apex

Le microgreffage d'apex de *citrus* a été mis au point par NAVARRO et al (1975) pour pallier les échecs de la reprise des méristèmes des espèces ligneuses. Selon BEN ABDALLAH et al (1996), chez la vigne, cette technique constitue une alternative rapide et efficace pour régénérer des lignées saines et conformes (maintien de la stabilité génétique des plants obtenus *in vitro*).

---

Les plantes de *citrus* obtenues par le microgreffage d'apex ne retournent pas à l'état juvénile et ne présentent pas de changements morphologiques par rapport aux plants mères dont elles sont issues (NAVARRO et al., 1975)

Chez la même espèce, les tentatives de régénérer des plantes à partir de culture de méristèmes ont échoué. Cependant le greffage de dômes méristématiques sur des semis sains de porte-greffes cultivés *in vitro* a fourni des plants microgreffés se développant normalement et exempté des principaux virus (Tristeza) (LEPOIVRE et SEMAL, 1993).

Chez la vigne, la nécessité depuis quelques années d'éliminer deux virus : l'écorce liégeuse et le complexe cannelures du tronc, considérés comme thermorésistants, a conduit à mettre en œuvre une autre méthode d'assainissement : le microgreffage d'apex qui permet d'obtenir des plants indemnes de ces viroses (BENIN et GRENNAN, 1984 ; AYUSO, 1985 ; BEN ABDALLAH, 1996).

#### **5.4/ Cultures des cellules isolées**

L'existence de cellules non infectées au sein des tissus d'une plante virosée, ainsi que la totipotence des cellules végétales peuvent être exploitées pour produire des plantes saines ; certains tymovirus induisent sur les feuilles des plantes infectées des zones vertes individualisées qui se détachent sur un fond de couleur jaune (LEPOIVRE et SEMAL, 1993).

Chez le chou chinois infecté par le virus de la mosaïque jaune de navet (TYMV), les feuilles sont formées d'un ensemble de cellules saines qui constituent des îlots verts ; des plantes régénérées à partir de ces îlots verts se sont avérées saines (LEPOIVRE et SEMAL, 1993).

#### **5.5/ Utilisation des inhibiteurs de la réplication virale**

En 1977, LERCH a constaté que les parties apicales des plantes de tabac infectées par le virus X de la pomme de terre et traité au virazole ne contenaient pas de virus après plusieurs subcultures.

Le rivazole (ribavirine) est un analogue de nucléoside de synthèse, qui possède une action viro-inhibitrice vis à vis d'une gamme étendue de virus pathogènes des plantes. Ce composé n'est pas virocide, mais c'est un inhibiteur de la réplication virale (LEPOIVRE et SEMAL, 1993).

Des résultats positifs ont été obtenus à partir de méristèmes de pommes de terre infectées par les virus Y, X et S, dont l'incorporation de virazole au milieu de culture augmente le taux de plantes assainies. Par ailleurs, à partir de protocormes d'orchidées infectées par le virus des anneaux nécrotiques de l'*odontoglossum* et après quatre subcultures en présence de virazole, les plantules obtenues se sont avérées saines sur base de test Elisa (LEPOIVRE et SEMAL, 1993).

---

## 1/ MATERIEL VEGETAL

### 1.1/ Origine du matériel végétal

Le matériel végétal utilisé au cours de notre expérimentation est représenté par trois variétés locales de vigne de table (*Vitis vinifera* L.) : Ahmar bou amar, Valensi et Muscat de cherchell. La provenance de ces variétés est indiquée au Tableau 07

**Tableau 07: variétés de vigne de table utilisées et régions d'origine**

VARIETE	CLONE		REGIONS D'ORIGINE
	N° DE LA RANGEE	N° DE LA SOUCHE	
AHMAR BOU AMAR	21	33	Benchicao (Médéa) à 65 Km du sud d'Alger
VALENSI	10	09	Benchicao (Médéa) à 65 Km au sud d'Alger
MUSCAT DE CHERCHAL	03	15	Cherchell (Tipasa) à 79 Km à l'ouest d'Alger.

### 1.2/ Caractéristiques des variétés étudiées

#### 1.2.1/ La variété Ahmar bou amar

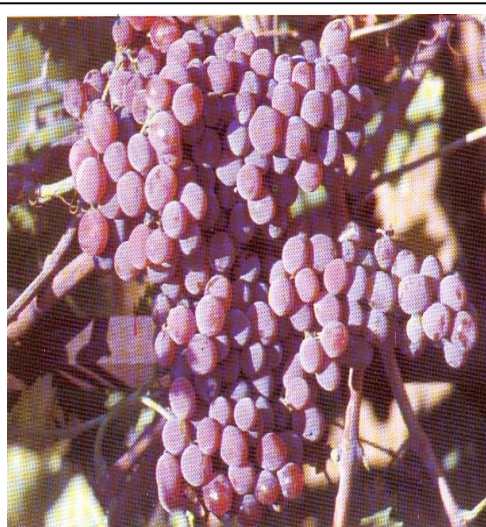
- C'est un cépage autochtone cultivé dans toute la Kabylie, ainsi que dans la plupart des régions montagneuses : Tlemcen, mascara et c'est à Médéa et au voisinage de Jijel que se rencontrent les superficies les plus importantes.
- La culture de ce cépage n'est pas à recommander en plaine où il pourrit facilement.
- Sa maturité s'étend du 15 septembre au 15 novembre.
- C'est un beau cépage de table à grandes grappes, aux grains très gros d'une belle couleur rose ou rouge vif (Figure 19), d'une saveur assez agréable pas trop sucrée. Il ne devient réellement d'un beau rose qu'en altitude.
- Il est vigoureux à fertilité élevée, il donne des rendements appréciables.
- Il est sensible au mildiou, à l'oïdium et à la pourriture grise. (ITAFV, 2000).

#### 1.2.2/ La variété valensi ou Mokrani

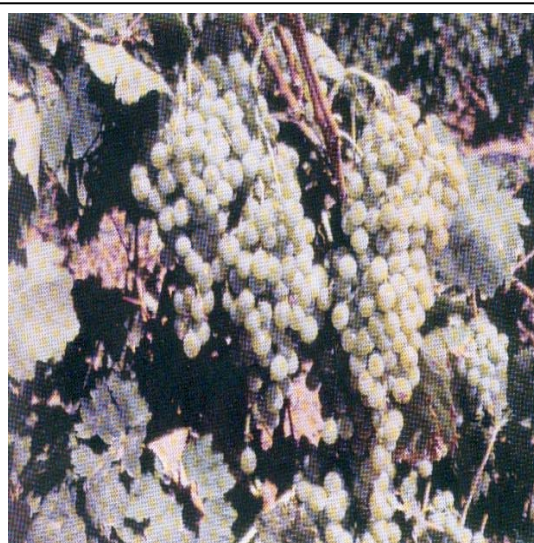
- C'est un cépage autochtone cultivé dans les régions de Tlemcen, mascara, Médéa, Rélizane et Meghnia.
- Il est très apprécié par les viticulteurs pour sa rusticité, sa production régulière et sa résistance au transport.
- Il est vigoureux et très fertile, d'une belle couleur jaune doré (Figure 20). Il demande à être cultivé de préférence en zone de montagne où il acquiert sa beauté caractéristique.
- Il est sensible au mildiou, à l'oïdium, mais résiste au transport et à la pourriture grise grâce à sa peau épaisse. (ITAFV, 2000).

### 1.2.3/ Muscat de Cherchell.

- C'est un cépage originaire de la méditerranée orientale : Muscat d'Alexandrie.
- C'est un beau cépage blanc à grappe moyenne et à grains ovoïde (Figure 21), à saveur musquée spéciale qui est très appréciée.
- Il n'acquiert toutes ses qualités qu'au voisinage immédiat de la mer : Ténès, Cherchell, Tipasa et Dellys.
- Il arrive sur le marché entre le 10 août et le 20 septembre.
- C'est un cépage de vigueur moyenne, qui possède une bonne fertilité et qui assure de bons rendements. (ITAFV, 2000).



**Figure 19 : la variété Ahmar bou amar (ITAFV, 2000), (x 0.3)**



**Figure 20 : la variété Valensi (ITAFV, 2000), (x 0.2)**



**Figure 21 : la variété Muscat de Cherchell (ITAFV, 2000), (x 0.15)**

### **1.3/ Préparation du matériel végétal**

#### **1.3.1/ Prélèvement et conservation du bois**

A la fin du mois de janvier 2002, pendant le repos végétatif (lors de la taille) ; des baguettes de bois de vigne des trois variétés sont prélevées à partir des souches marquées au vignoble.

Les baguettes de bois sont mises dans des sachets en plastique bien fermés, étiquetés et conservés en chambre froide à + 4° C.

#### **1.3.2/ Stratification**

La stratification est une opération très importante dans la réussite de la reprise des plants ; en effet la finalité de cette opération constitue le début de la vie active des boutures, en stimulant la formation des racines à la base et le débourrement des bourgeons.

Les baguettes de bois de vigne sont coupées en section de 3 à 4 nœuds selon la longueur des entre nœuds à raison de 40 centimètres environ ; la taille à la partie basale doit se faire le plus pré-possible sous le nœud.

Les boutures sont disposées dans des caisses contenant de la sciure humide (figure : 22 et 23). Les caisses sont ensuite stockées dans une chambre chaude à l'obscurité à une température qui varie de 28°C à 30° C, une humidité de 70 % à 80 % et une aération régulière.

#### **1.3.3/ Forçage sous serre**

Après 4 à 5 semaines de stratification, seuls les plants présentant un bon système racinaire sont sélectionnés (figure : 24). Ces plants sont repiqués dans des sachets en plastique remplis de substrat composé de 1/3 de sable, 1/3 de tourbe, 1/3 de terre, en plus de marc de raisin et désinfecté par un générateur à vapeur (figure : 25),.

Les plants de vigne sont mis sous serre chauffée à 28 °C. Une solution nutritive à base de KNOP (Annexe : 01) est apportée avec l'eau d'irrigation selon le besoin (1 à 2 arrosages par semaine).

#### **1.3.4/ Défoliation**

Après 3 à 4 semaines de forçage, les bourgeons débourrent et donnent de nouvelles pousses (figure : 26).

Toutes les feuilles qui arrivent à maturité sont éliminées dans le but de lever la dormance des bourgeons axillaires (figure : 27), une partie des feuilles éliminées est destinée pour la détection des virus par le test sérologique Elisa et par inoculation mécanique, alors que les pousses végétatives issues des bourgeons axillaires sont destinées à la culture *in vitro* de méristèmes.



**Figure 22 : stratification des boutures de vigne (x 0.07)**



**Figure 23 : stratification des boutures de vigne (x 0.06)**



**Figure 24 : formation des racines (x 0.08)**



**Figure 25 : forçage sous Serre (x 0.08)**



**Figure 26 : débourrement des bourgeons (x 0.04)**



**Figure 27 : défoliation (x 0.2)**

## 2/ METHODES EXPERIMENTALES

### 2.1/ Méthodes de détection des viroses

#### 2.1.1/ Méthodes d'observation directes des symptômes

En juin 2002, plusieurs prospections visuelles des symptômes ont été effectuées au vignoble, pour noter les symptômes sur feuilles et sur rameaux.

Les symptômes sont observés également et notés après un bon développement des plants cultivés sous serre (40 jours après le repiquage) et jusqu'à la fin du cycle végétatif (septembre- octobre).

#### 2.1.2/ Méthode biologique : inoculation mécanique sur indicateurs herbacés

##### 2.1.2.1/ Principe

L'inoculation mécanique est une méthode biologique qui consiste à transmettre les particules virales par voies mécaniques à des plantes indicatrices saines (CORNUET, 1987 ; CLOQUEMIN, 1988 ; GILES et VERHOYEN, 1992).

##### 2.1.2.2/ Préparation des plantes indicatrices

Pour la transmission mécanique du virus de l'enroulement foliaire (GLRaV), nous avons opté pour l'utilisation de trois variétés appartenant à trois familles botaniques :

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

Les semences des plantes indicatrices ont été semées dans des pots remplis d'un substrat désinfecté, composé de 1/3 de terre, 1/3 de sable et 1/3 de tourbe ; nous avons utilisé 15 semences pour chaque variété.

##### 2.1.2.3/ Préparation de l'inoculum

L'extraction du virus se fait dans un mortier préalablement maintenu au froid, par broyage de 1g de feuilles de vigne virosée (variété Muscat de Cherehell) dans 5 ml de tampon phosphate (qui a pour effet de stabiliser le virus) (Annexe 02), contenant de la nicotine base en solution aqueuse à 2.5 % (qui permet la neutralisation et la précipitation des tannins qui inactivent le virus dans le jus).

L'extrait obtenu est additionné de 100 mg.ml<sup>-1</sup> de charbon actif (pour absorber les composés toxiques libérés lors de l'extraction).

---

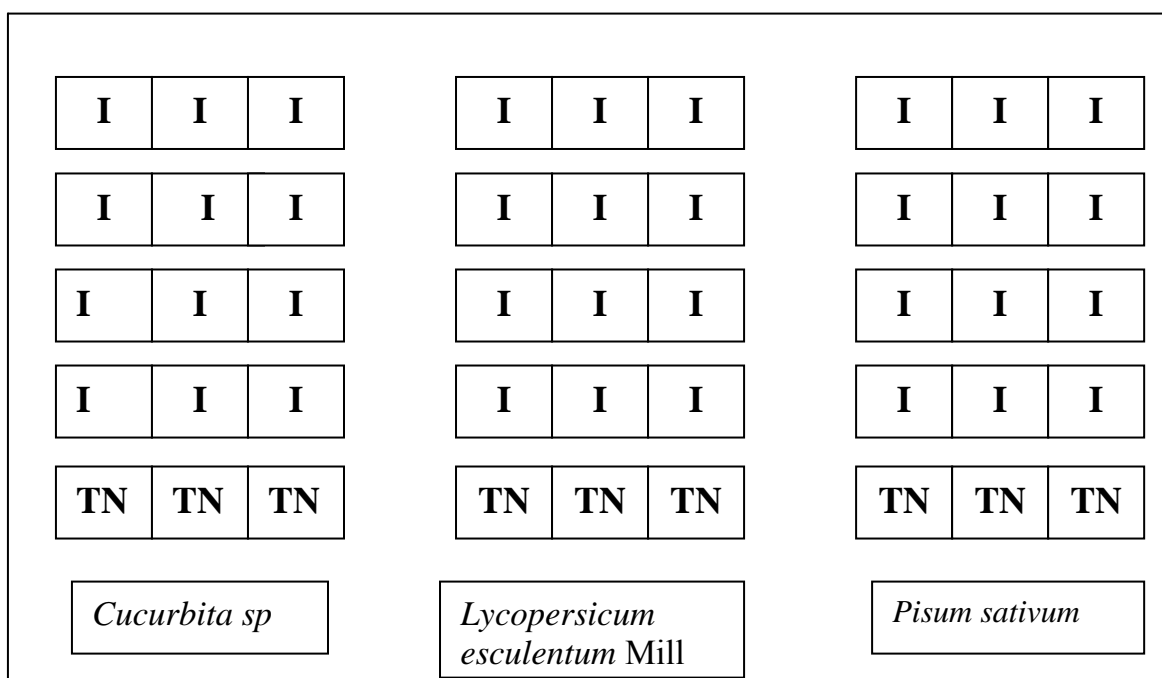
### 2.1.2.4/ Mode opératoire

L'inoculum obtenu est appliqué par légers frottements à l'aide d'une tige cotonnée sur la surface des jeunes feuilles ou cotylédons, préalablement saupoudrés de célite à effet abrasif, permettant la pénétration du virus.

Les plants inoculés sont rincés à l'eau courante pour éviter les lésions des feuilles ou cotylédons par l'abrasif et sont conservés en serre à 25°C.

L'observation des symptômes est faite à intervalle de trois jours à partir du 6<sup>ème</sup> jour et ce durant 15 jours.

Nous avons ainsi inoculé une souche de Muscat de Cherehell sur 3 espèces indicatrices : *Cucurbita sp* au stade cotylédon, *Lycopersicum esculentum* Mill. au stade 3 à 4 feuilles et *Pisum sativum* au stade 3 à 4 feuilles (3 répétitions ont été faites pour chacune et pour chaque répétition nous avons inoculé 4 plants et un plant non inoculé est gardé comme témoin, soit au total 45 plants) (Figure : 28).



**I** Plante indicatrice inoculée

**TN** Témoin négatif (plante indicatrice non inoculée)

**Figure 28: dispositif expérimental utilisé pour l'inoculation mécanique de Muscat de Cherehell**

### 2.1.3/ Méthode sérologique

#### 2.1.3.1/ Matériels nécessaires au test Elisa

##### ❖ Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour la détermination des virus par voie sérologique est représenté dans le Tableau : 08

**Tableau 08: matériel végétal utilisé pour le test Elisa**

MATERIEL VEGETAL	VARIETE	PERIODE DE PRELEVEMENT
VIGNES	Ahmar bou amar Valensi Muscat de Cherchell	Printemps Printemps Printemps
PLANTES INDICATRICES	La courgette La tomate Le petit pois	15 jours après l'inoculation mécanique 15 jours après l'inoculation mécanique 15 jours après l'inoculation mécanique

##### ❖ Les sérums utilisés

Le test Elisa a été réalisé avec les trousse commercialisées par la firme française Sanofi. Chaque trousse contient les plaques de microtitration et les produits nécessaires à la détection d'un virus.

Nous avons utilisé le sérum anti- GFLV (le court-noué) et son conjugué dilué à 1/1000, le sérum anti-GLRVA type I et III (l'enroulement foliaire) et son conjugué dilué à 1/1000 et le sérum anti-GFKV (la marbrure) et son conjugué dilué à 1/1000.

#### 2.1.3.2/ Principe du test Elisa

Le test Elisa (enzyme linked immuno sorbent assay) est une technique qui consiste à inclure l'antigène viral entre deux couches d'anticorps dont la deuxième est conjuguée à l'enzyme.

Pour la détection de nos échantillons, nous avons utilisé la méthode classique directe DAS (double antibody sandwich) pour la mise en évidence des virus du court noué, de l'enroulement foliaire et de la marbrure.

#### 2.1.3.3/ Mode opératoire

##### ❖ *Fixation des anticorps sur la paroi de la plaque*

- Déposer 200µl / puits de la solution de fixation (Annexe 03) contenant les anticorps, ce qui facilite leur adsorption sur le polystyrène de la plaque.
- Couvrir les plaques et mettre en incubation dans une étuve à 37°C pendant 3 heures (Figure : 30).

### ❖ *Préparation de l'antigène*

Les échantillons à analyser (feuilles de vigne et des plantes indicatrices) sont découpés en petits morceaux et mis dans des sachets en plastique numérotés.

Ils sont ensuite broyés dans un tampon d'extraction à raison de 5ml pour un gramme de feuilles. Le broyat ainsi obtenu est centrifugé à 3000 tours de 5 à 10 mn, pour permettre sa décantation.

L'extrait obtenu est maintenu à une température de 4°C jusqu'à son utilisation.

### ❖ *lavage des plaques*

- Vider les plaques par retournement
- Remplir chaque puits avec la solution PBS-Tween (Annexe 03).  
Trois lavages sont faits pendant 10 mn, la solution de lavage élimine les anticorps non accrochés aux parois de la plaque.

### ❖ *Fixation des antigènes aux anticorps.*

- Déposer 200µl de témoin négatif dans les puits indiqués TN, et 200µl de témoin positif dans les puits indiqués TP.
- Déposer 200µl d'antigène (broyat de feuilles préalablement préparé) dans chaque puits correspondant selon un schéma établi auparavant (Figure : 29).
- Après chaque dépôt des témoins et des échantillons, le cône de la micropipette est jeté.
- Couvrir et incuber les plaques pendant une nuit à 4°C.
- Laver comme précédemment : la solution de lavage élimine les particules virales non accrochées aux anticorps (Figure :30).

### ❖ *Fixation des anticorps conjugués à enzyme sur les antigènes*

- Distribuer 200µl de la solution du conjugué (anticorps + enzyme : la phosphatase alcaline) (Annexe 03) dans chaque puits de la plaque (témoins et échantillons).
- Couvrir les plaques et mettre en incubation dans une étuve à 37°C pendant 3 heures.
- Laver comme précédemment : la solution de lavage élimine dans ce cas le conjugué non accroché aux virus.

### ❖ *Dépôt du substrat*

- Pour une plaque, dissoudre ½ pastille de P. Nitrophenyl-phosphate PNPP dans 21 ml de solution de substrat (Annexe 03).
- Distribuer 200µl de la solution finale dans chaque puits de la plaque (témoins et échantillons) pour révéler la présence de l'enzyme et par conséquent du virus.
- Couvrir les plaques et mettre en incubation à température ambiante, cela permet à

la réaction chimique ( hydrolyse avec l'enzyme) de se réaliser.  
 La réaction chimique entre l'enzyme et le substrat incolore transforme ce dernier en un produit coloré. De ce fait, la coloration n'apparaît que dans les puits où l'enzyme est présent, donc où se trouve les échantillons virosés.

❖ *Lecture des résultats*

Après 1 heure d'incubation à température ambiante, les plaques sont passées au spectrophotomètre à 405nm de densité optique.

Le résultat des réactions du test Elisa est donné par l'intensité de la coloration évaluée par la lecture de la densité optique qui est comparée à celle du témoin négatif.

Un échantillon est considéré positif (virosé) quand la densité optique du puits correspondant est supérieure à celle du témoin négatif (sain).


	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		H	TP <sub>1</sub>		H	TP <sub>2</sub>	H	TP <sub>3</sub>		H	TP <sub>4</sub>	
C		H	TP <sub>1</sub>		H	TP <sub>2</sub>	H	TP <sub>3</sub>		H	TP <sub>4</sub>	
D		V	TN		V		V			V		
E		V	TN		V		V			V		
F		M			M		M			M		
G		M			M		M			M		
H												

H : Ahmar bou amar

V : Valenci

M : Muscat de Cherchell

TN : Témoin négatif

 Eau distillée

TP<sub>1</sub> : Témoin positif GFLV

TP<sub>2</sub> : Témoin positif GFKV

TP<sub>3</sub> : Témoin positif GLRaV (I)

TP<sub>4</sub> : Témoin positif GLRaV (III)

**Figure 29: schéma de la plaque Elisa**

- - - - -  
 Incubation /  
 3 h à 37°c Lavage  
 3fois / 10 mn  
 - - - - -

Fixation : dépôt de 200µl  
 d'anticorps / puit .

- - - - -  
 Incubation /  
 une nuit à 4°c Lavage  
 3fois/ 10mn  
 - - - - -

Dépôt de 200µl d'extrait  
 (Échantillon ) / puit .

- - - - -  
 Incubation /  
 3h à 37°c Lavage  
 3 fois/ 10mn  
 - - - - -

Dépôt de 200 µl de  
 conjugué / puit .

- - - - -  
 Incubation à lecture de la  
 température densité optique au  
 - - - - - spectrophotomètre à  
 405 nm.

Dépôt de 200 µl de  
 substrat / puit .

( ) Anticorps. ( ) Echantillon. ( ) Conjugué. ( ) Substrat.

Figure 30 : Protocole utilisé pour le test Elisa direct dit «sandwich »  
 (CLARK et ADAMS, 1977).

## 2.2/ Méthodes d'assainissement et de régénération par culture *in vitro* de méristèmes

### 2.2.1/Technique de stérilisation

#### 2.2.1.1/ Stérilisation du matériel du laboratoire

Le maintien des cultures en conditions aseptiques sous entend la stérilisation des milieux de culture, d'instruments de manipulation et de dissection, de l'eau de rinçage...etc. ainsi :

- toutes les manipulations se font sous hotte à flux laminaire horizontal.
- l'eau distillée servant au rinçage du matériel végétal est stérilisée à l'autoclave à 120 °C pendant 60 minutes.
- les pinces, scalpels, bistouris et toute la verrerie sont stérilisés à l'étuve à 180 °C pendant une heure

#### 2.2.1.2/ Stérilisation des milieux de culture

Les milieux de culture distribués dans des tubes sont stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C avant d'être distribué sous hotte.

Pour les cultures réalisées dans des boites de pétri stériles, le milieu de culture est stérilisé à 120°C pendant 20 minutes avant d'être distribué sous hotte.

#### 2.2.1.3/ Stérilisation du matériel végétal

Nous avons prélevé l'extrémité apicale des pousses sur des jeunes plantes cultivées en pots et maintenue sous serre. La stérilisation du matériel végétal est réalisée sous hotte à flux laminaire.

Après élimination des feuilles et des vrilles, la désinfection des pousses végétatives est réalisée selon 4 méthodes (Tableau 09) afin de retenir la plus appropriée à notre matériel.

**Tableau 09 : méthodes de désinfection du matériel végétal utilisées**

1 <sup>ERE</sup> METHODE	2 <sup>EME</sup> METHODE	3 <sup>EME</sup> METHODE	4 <sup>EME</sup> METHODE
- lavage des pousses à l'eau du robinet	- lavage des pousses à l'eau du robinet	- lavage des pousses à l'eau du robinet	- lavage des pousses à l'eau du robinet
- trempage dans l'alcool à 70 % pendant 30 secondes	- trempage dans l'alcool à 70 % pendant 30 secondes	- trempage dans l'alcool à 70 % pendant 30 secondes	- trempage dans l'alcool à 70 % pendant 30 secondes
- trempage dans l'hypochlorite de sodium à 3 % pendant 5mn, 10 mn et 15mn.	- trempage dans l'hypochlorite de sodium à 8 % pendant 5mn, 10 mn et 15mn.	- trempage dans l'hypochlorite de calcium à 7 % pendant 5mn, 10 mn et 15mn.	- trempage dans l'hypochlorite de calcium à 10 % pendant 5mn, 10 mn et 15mn.
- rinçage à l'eau distillée stérile 3 fois pendant 10 mn.	- rinçage à l'eau distillée stérile 3 fois pendant 10 mn.	- rinçage à l'eau distillée stérile 3 fois pendant 10 mn.	- rinçage à l'eau distillée stérile 3 fois pendant 10 mn.

### 2.2.2/ Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés comprennent les sels minéraux (macro et micro-éléments), de l'eau, des vitamines, une source de carbone ainsi que des régulateurs de croissance.

Nous avons testé deux milieux de culture :

Milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) (Annexe : 04)

Milieu de CHEE et POOL (1987) (Annexe : 05).

Dans tous les essais, la source énergétique de carbone est le saccharose qui est ajouté au milieu de culture à raison de 20 g.L<sup>-1</sup>.

Les principaux régulateurs de croissance utilisés sont les suivants :

**Les auxines** : l'acide indole butyrique (AIB)  
l'acide naphthalène acétique (ANA)

**Les cytokinines** : la 6 benzylaminopurine (BAP)

**Les gibbérellines** : l'acide gibbérellique (GA<sub>3</sub>).

Les régulateurs de croissance ont été utilisés seuls ou associés à des concentrations variables selon la phase de développement des cultures.

Le pH des milieux de culture est ajusté à 5,8 avec une solution de soude (NaOH) à 0,1N ou une solution d'acide chlorhydrique (HCl) de 0,1N, selon le cas.

Les milieux de culture sont ensuite solidifiés par 8 g.L<sup>-1</sup> d'agar (milieu solide) et distribués dans des tubes en pyrex (16 cm de longueur sur 2,5 cm de diamètre) ou dans des bouteilles de jus ou des bocaux de conserve autoclavables, à raison de 20ml par tube, 100 ml par bocal et 50 ml par bouteille.

Pour les boîtes de pétri (9 cm de diamètre), le milieu autoclavé au préalable est distribué sous hotte à raison de 25 ml par boîte.

Les tubes de cultures sont obturés au moyen de bouchon en polycarbonate, par contre les boîtes de pétri sont scellées par du parafilm nettoyé à l'éthanol 70°.

#### 2.2.2.1/ Milieu de culture d'initiation

Nous avons testé deux milieux différents dans leurs composition en macro-éléments, en micro-éléments et en vitamines (Annexe 04 et 05), dans le but de déterminer le milieu le mieux adapté à notre matériel végétal (la vigne).

**Tableau 10 : concentration en substances de croissance des milieux d'initiation.**

SUBSTANCES DE CROISSANCE	MILIEU MS (62)				MILIEU CP (87)			
	MS <sub>0</sub>	MS <sub>1</sub>	MS <sub>2</sub>	MS <sub>3</sub>	CP <sub>0</sub>	CP <sub>1</sub>	CP <sub>2</sub>	CP <sub>3</sub>
CYTOKININE: BAP(mg.L <sup>-1</sup> )	/	1	1.5	1.5	/	1	1.5	1.5
AUXINE : ANA (mg.L <sup>-1</sup> )	/	/	/	0.2	/	/	/	0.2

### 2.2.2.2/ Milieu de multiplication

Après un séjour d'un mois dans le milieu d'initiation (Tableau 10), les explants obtenus sont transplantés dans le milieu de multiplication CP<sub>2</sub> (Tableau 11)

**Tableau 11: milieu de multiplication et de bourgeonnement**

MACROELEMENTS	MICROELEMENTS	VITAMINES	CHELATES DE FER	AUTRES
CP (87) modifié : Diminution de 1/3 des macroéléments	CP (87)	MOREL et MARTIN (52) (Annexe 06)	CP (87)	Saccharose: 30g.L <sup>-1</sup> BAP: 1.5 mg.L <sup>-1</sup> Agar: 8 g.L <sup>-1</sup> PH: 5.8

### 2.2.2.3/ Milieu d'allongement et d'enracinement :

Après 3 à 4 subcultures, les vitroplants obtenus sont transplantés dans le milieu CP (87) modifié, et avec 1mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>.

### 2.2.2.4/ Phase d'acclimatation

Les vitroplants obtenus après l'étape d'enracinement sont retirés des tubes de culture (bocaux ou bouteilles de jus). Les racines sont soigneusement lavées avec de l'eau distillée stérile afin de les débarrasser du milieu de culture restant, puis sont placés en mini-serre d'acclimatation sur un substrat stérile contenant un mélange de tourbe et de perlite ; le substrat ayant été autoclavé pendant une heure à 120°C.

Les mini-serres restent fermées pendant au moins trois jours pour garder une atmosphère saturée d'humidité. Ensuite nous procédons d'une façon progressive à l'ouverture des fenêtres pour permettre aux vitroplants de s'adapter aux conditions naturelles.

La température de la mini-serre est de 24°C le jour et 18°C la nuit ; les plantules ne sont arrosées qu'au bout d'une semaine avec une eau contenant un fongicide.

## 2.2.3/ autres facteurs étudiés

### 2.2.3.1/ type d'explant méristématique utilisé

Les méristèmes sont isolés aseptiquement sous la loupe binoculaire équipée de lumière froide, à l'aide de fragments de lames de rasoirs montées sur des portes aiguilles (Figure :31) ; pour cet essai, nous avons testé deux lots de 20 méristèmes de constitution différentes :

**T<sub>1</sub>** représente le dôme apical sans primordia foliaire.

**T<sub>2</sub>** représente le dôme apical avec les deux dernières primordia foliaires.

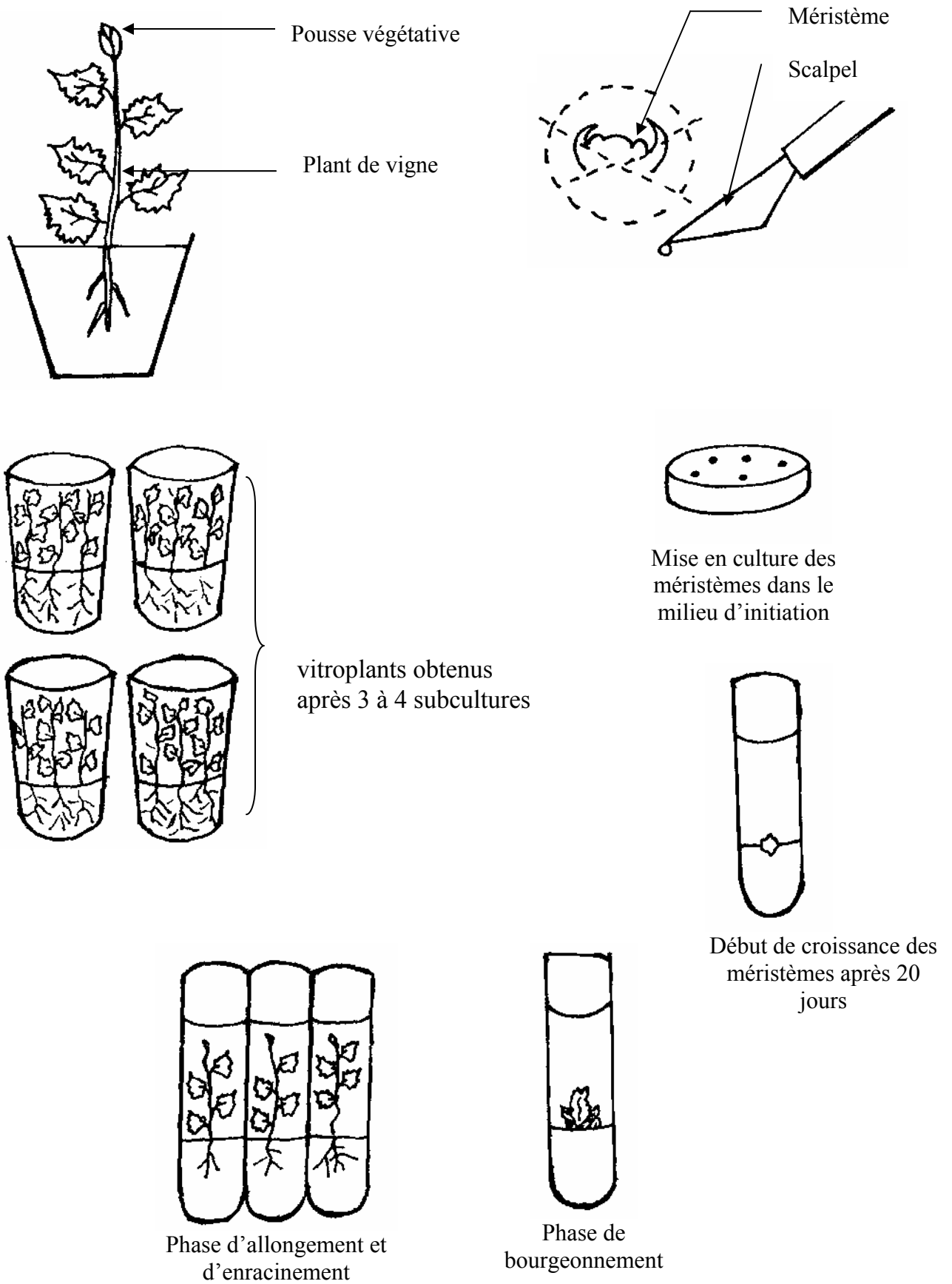


Figure 31 : schéma des différentes étapes de la culture *in vitro* des méristèmes de la vigne

Les méristèmes sont placés dans des boîtes de pétri contenant 25 ml de milieu de culture MS (62) avec  $1.5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP à raison de 5 méristèmes par boîte pour minimiser le nombre de contamination.

Après la mise en culture, les boîtes de pétri sont placées dans une salle de culture équipée par des étagères éclairées donnant une intensité de lumière de 1800 lux, la photopériode est de 16 heures d'éclairage et 8 heures d'obscurité.

### 2.2.3.2/ Influence de la température du jour

Dans le but de déterminer la température favorable au développement des méristèmes de vigne cultivés *in vitro*, nous avons cherché à tester l'effet de la température du jour en fixant la température de nuit à  $18^{\circ}\text{C}$  ; à cet effet nous avons mis en culture trois lots de 20 méristèmes sur le milieu MS (62) avec  $1.5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP, à la température  $20^{\circ}\text{C}$ ,  $24^{\circ}\text{C}$  et  $28^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.4/ Contrôle de l'état sanitaire des vitroplants obtenus

Après un séjour de 1 mois dans la mini-serre d'acclimatation, un contrôle de l'état sanitaire des vitroplants obtenus par culture *in vitro* de méristème est effectué par le test Elisa (Figure : 30), dans le but de déterminer le pourcentage de guérison.

## 3/TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES.

Les résultats ont été analysés statistiquement par le logiciel STATITCF.

Le type du dispositif expérimental adopté dans notre expérimentation est une randomisation totale à un ou à deux facteurs. Chaque facteur comprend différents niveaux ; ainsi le nombre de traitement de base correspond à la combinaison entre les différents niveaux des facteurs étudiés et chaque traitement de base est répété plusieurs fois selon les expériences (voir Annexe 07).

La signification des différences entre les traitements est exprimée en fonction de la probabilité (p).

Erreur à 5 % :  $P > 0.05$  : différence non significative

$P < 0.05$  : différence significative

$P \leq 0.01$  : différence hautement significative

$P \leq 0.001$  : différence très hautement significative.

Le test de NEWMAN et KEULS permet de constituer les groupes de traitements homogènes en se basant sur les petites amplitudes significatives (PPAS) lorsque l'amplitude observée entre les moyennes extrêmes d'un groupe de K moyennes sera inférieure à la PPAS.

- ABDENNOUZ A., 1995.** Culture de la vigne : techniques de production de la vigne  
Institut technique d'arboriculture fruitière et de la vigne ITAFV, 29 pages
- ABOU GHANEM N., 1993.** Étude comparative entre divers isolats du virus B de la vigne (GVB). Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes. Bari- Italie, 82 pages.
- ABRACHEVA P., 1992.** Les maladies à virus et les maladies de type viral de la vigne en Bulgarie. Progrès Agricoles et Viticoles 109 (20). p 434-436.
- ABROUS M.C., 1993.** Compte rendu de la 1<sup>ère</sup> réunion de coordination réseau vigne : la viticulture en Algérie. PNUD. FAO. RAB/ Tunis. p 28-24.
- AGGAD H., 1988.** Matériel, méthodes et technique de détection des maladies à virus sur vigne. Cours on «sanitation and protection of méditerranéen fruits crops ». 22 pages.
- AMEDJKOUH H., 1999.** Mise en évidence de deux maladies virales : le court noué et l'enroulement foliaire sur une variété de vigne de table : le dattier de Beyrouth (*Vitis vinifera* L). Thèse DES. Usthb. Alger, 44 pages.
- ANONYME., 1999.** Micropropagation en entreprise. Cahier de références techniques. Ed CIDES. 43 pages.
- AOUF M.B., 1984.** État et perspectives de développement de la viticulture en algérie. Thèse doctorat d'état. Acad. des sciences agro. Sofia. 132 pages.
- AUBERT A., VULLIN G., 1997.** Pépinière et plantation d'agrumes. Ed GIRARD, France. p 63-68.
- AUGE R., BEAUCHESNE G., BOCCON-GIBBOD J., DECOURTYE I., DIGAT B., GALANDRIN Y.C.I., 1984.** La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Ed J.B. Baillièrè. Paris. 152 pages.
- AUGE A., 1989.** La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Chapitre 2 : les phénomènes physiologiques liés à la réalisation des cultures *in vitro*. p 7-29. Ed Lavoisier Tec et Doc. J.B Baillièrè. 225 pages
- AUGE R., BOCCON-GIBBOD J., 1989.** La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Chapitre 5 : les applications à l'horticulture. p 63-89. Ed Lavoisier Tec et Doc. J.B Baillièrè. 225 pages.
- AYUSSO P., 1985.** Le microgreffage appliqué à la régénération sanitaire de la vigne. Coll. Amélioration de la vigne et culture *in vitro*. Paris, p 191-192.
-

- BALL E., 1946.** Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *Tropalum majus* L and *Lupinus albus* L. Ann. J. Bot (33). p 301-318.
- BALTHAZARD J., 1993.** Valeur culturale du gerwrtraminer clone N° 913 guéri du virus de l'enroulement par thérapie. Progrès Agricoles et Viticoles 110 (18). p 113-120.
- BARLASS M., SKENE K.G., 1988.** In vitro propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L) from fragmented shoot apices. Vitis 17. p 335-340.
- BASS P., VUITTENEZ A., 1977.** Amélioration de la thérapie des vignes virosées au moyen de la culture d'apex sur milieux nutritifs ou par greffage sur vignes de semis , obtenus aseptiquement *in vitro*. Ann phytopathol 9, p 539-540.
- BEAUCHESNE G., 1989.** La culture in vitro et ses applications horticoles. Chapitre 1 : l'histoire et les fondements de la culture in vitro, p 1-5. Ed Lavoisier Tec et Doc. J.B Bailliere. 225 pages
- BEN ABDALLÂH F., FNAYOU A., GRENAN S., GHORBEL A., 1996.** Contribution à l'amélioration du microgreffage de la vigne. Bulletin de l'OIV. P 602-616.
- BEN ABD RABOU A., 1972.** Contribution à l'étude de la fertilité de la vigne. Thèse. DEA. Dijon. 37 pages.
- BENCHIHA A.K., 1976.** Contribution à l'étude des nématodes (*Xiphinema cobb*.1913) vecteurs de la dégénérescence infectieuse de la vigne dans la région de mostaganem. Thèse .ING. INA. Alger. 67 pages.
- BENIN M., GRNAN S., 1984.** Le microgreffage: nouvelle technique d'élimination des virus de la vigne. Progrès Agricoles et Viticoles 2. p 33-36.
- BESSIS R., LABROCHE C., 1985.** Callogenèse et régénération chez le Pinot, le Chardonnay et le Gamay. Coll. Amélioration de la vigne et culture in vitro, Paris, p 127-134.
- BIGOT C., ANSTETT A., 1992.** Les cultures spéciales. Le bon jardinier, Encyclopédie Horticole, JEAN-NOEL BURTE. 153<sup>eme</sup> Ed, la maison rustique. P 587-609.
- BINI G., 1976.** Prove di coltura in vitro di meristeme apicali di *Vitis vinifera* L. Riv . Ortofloro. Fruittic. Ital (60). p 289-295.
- BIRBENT P., 2001.** La vigne en algérie. AFN Collection, N° 28. 10 pages.
-

- BOCCON-GIBBOD J., 1989.** La culture in vitro et ses applications horticoles.  
Chapitre 3 : les besoins nutritifs des tissus cultivés en condition aseptique.  
P 31-36.  
Chapitre 04 : la technologie de la culture in vitro. P 37-62.  
Ed Lavoisier Tec et Doc. J.B Bailliere. 225 pages.
- BOSCIA D., MARTELLI G.P., SAVIN V., CASTELLANO M.A., 1991**  
Identification of the agent of grapevine fleck diseases. Vitis 30. p 97-105.
- BOSCIA D., GRIEF C., GUGERLI P., MARTELLI G.P., WALTER B.,  
GONSALVES D., 1995.** Nomenclature of grapevine leafroll associated  
punative closterovirus. Vitis 34. 13 pages.
- BOUBALS D., PISTRE R., 1978.** Résistance de certains vitacées et des portes  
greffes usuels en viticulture au nématodes *Xiphinema index* et à  
l'inoculation par le virus du court noué (GFLV). II<sup>eme</sup> symp. Intern. Sur  
l'amélioration de la vigne. Bordeaux, 14-18 juin 1977, INRA. 200-207.
- BOUBALS D., 1991.** Étude de l'incomptabilité au greffage de certains cépages et du  
57 Richter. Progrès agricoles et viticoles 67. p 183-189.
- BOUBALS D., 2001.** Y'a -t- il une sensibilité différente des porte greffes au court  
noué de la vigne ? Progrès agricoles et viticoles 118 N° 13-14. p 317-318.
- BOUGUEDOURA N, 1991.** Connaissance de la morphogenèse du palmier dattier  
(*Phoenix dactylifera* L.). Étude *in situ* et *in vitro* du développement  
morphogénétique des appareils végétatifs et reproducteurs.  
Thèse de doctorat. USTHB, Alger, 201 pages.
- BOUQUET A., 1978.** La muscadine (*Vitis rotundifolia michx*) et sa culture aux Etats  
Unis. Conn. Vigne vin, 12. p 1-20.
- BOUQUET A., 1981.** Résistance to grape fanleaf virus in muscadine grape inoculated  
with *Xiphinema index*. Plant disease N° 65. p 791-793.
- BOUQUET A., 1983.** La recherche de porte greffes résistants, une voie nouvelle dans  
la lutte contre le court noué de la vigne. Progrès agricoles et viticoles 100.  
p 256-259.
- BOUQUET A., DANGLLOT Y., 1983.** Recherche de porte greffes de vigne résistants  
à la transmission du virus du court noué (GFLV) par le nématode  
*Xiphinema index* Thorne et Allen. Application de la méthode Elisa à la  
réalisation d'un test rapide de sélection. Agronomie 3. p 957-963.
-

- BOUQUET A., DANGLLOT Y., TORREGROSA L., BOUGIOVANNI M., CASTAGNONE SERENO P., ESMANJAUD D., DALMASSO A., 2000.** Breeding rootstocks resistant to grape fanleaf virus spread, using *Vitis x Muscadinia* hybridization. VII symposium on grapevine genetics and breeding. p 517-525.
- BOUSALEM M., 1981.** Contribution à l'étude du court noué dans les pépinières du littoral algérois. Thèse. ING. Agro. INA, Alger. 106 pages.
- BOVEY R., 1974.** Sélection sanitaire de la vigne en suisse romande. Revue. Suisse. Vitic. Arboric. Hortic. (6). p 77-83.
- BOVEY R., GARTEL W., HEWITT W.B., MARTELLI G.P., VUITTENEZ A., 1980.** Maladies à virus et affection similaires de la vigne. Atlas en couleurs des symptômes. Ed payot. Lausanne. Eurgen. Verlag. Paris.181 pages.
- BOVEY R., 1981.** Aspect de la sélection sanitaire de la vigne. II<sup>ème</sup> symposium international sur la sélection clonale de la vigne, Venise-Italie. p 293-301.
- BOVEY R., 1992.** Le rôle des porte- greffes dans la dissémination des maladies à virus et affections similaires de la vigne. Revue. Suisse. Vitic. Arboric. Hortic. Vol 24 (6). p 321-324.
- BOVEY R., MARTELLI G.P., 1992.** Directory of major virus and virus like diseases of grapevines (description, historical, review and bibliography). Med. Fr. Crop. Improvement Council (ICVG). 111 pages.
- BOXUS PH., 1978.** Cultures de tissus et assainissement. Extrait du compte rendu de la journée d'étude belgian, I.S.H.S., P 75-80.
- BRANAS J., 1974.** Viticulture. Ouvrage 3<sup>ème</sup> trimestre. Imp. Dehan, Montpellier. 975 pages.
- BRETAUDEAU J., FAURE Y., 1990.** Atlas d'arboriculture fruitière. vol 4, 263 pages.
- BRUGNON A., BESSIS R., 1968.** Biologie de la vigne : acquisitions récentes et problèmes actuels. Edit. Masson et Cie, France. 158 pages.
- BUVAT R., 1944.** Recherche sur la dédifférenciation des cellules végétales : plantes entières et boutures. Ann. Sci. Nat, N° 11 (5). p 1-130.
- CADMAN R., DIAS F., HARRISSON G., 1960.** Sap transmissible viruses associated with disease of grapevine in Europe and North America. Nature, 187. p 577-579.
-

- CALO A., 1970.** Influence du climat et les conditions de nutrition sur la fécondation et la nouaison des fruits de la vigne. Bulletin de l'OIV 588. p 903-913.
- CARLES L., 1985.** Le court noué de la vigne.  
Revue Arboric. Fruitière, N° 378, p 39-42.
- CARRE M., MARTIN T.J., MUSSILLON P., MARTIN C., 1979.** La culture de méristèmes et la multiplication végétative « in vitro » au service de la pépinière. Bulletin Petit Fruit, numéro spécial : culture de méristèmes, N° 14. 65 p.
- CAUDWELL A., LARRUE J., 1979.** Examen du problème de la flavescence dorée dans le cadre de la sélection sanitaire des bois et plants de la vigne.  
Progrès Agricoles et Viticoles N° 6, p 128-134.
- CHALUPA V., 1984.** *In vitro* propagation of oak (*Quercus robur* L) and linden (*Tilia cordata* MILL). Biol. Plant 26 (5). p 374-377.
- CHAMPAGNOL F., 1984.** Éléments de physiologie de la vigne et de viticulture générale. Imp. Dehan, Montpellier. 351 pages.
- CHAUVET M., 1979.** Manuel de viticulture. 3<sup>ème</sup> Ed, Bailliere, J.B, Paris. 319 pages.
- CHAUVET M., REYNIER A., 1979.** Manuel de viticulture.  
3<sup>ème</sup> Ed, Bailliere, J.B, Paris. 330 pages.
- CHEE R., POOL R.M., 1985.** *In vitro* propagation of vitis: the effects of organic substances on shoot multiplication. Vitis 24. p 106-118.
- CHÉE R., POOL R. M., 1987.** Improved inorganic media constituents for *in vitro* shoot Multiplication of vitis. Scientia horticultrae. 32. 85-95p.
- CLARK M.F., ADAMS A.N., 1977.** Characteristics of the microplate method of enzyme linked immuno sorbent assay for detection of plant viruses.  
J. Gene. Virol (34). P 475-483.
- CLICHE M., 1989.** La culture de la vigne.  
Conférence présentée à la société d'horticulture et d'écologie du nord de montréal. 14 pages.
- CLOQUEMIN J., 1988.** Le repérage précoce des maladies des plantes : les nouvelles techniques appliquées aux viroses. Ann du colloque ARRIA. p 97-107.
- CLOQUEMIN G., BLASZCZYK G., HEROLD D., GILLET J., 1998.** Les virus et la vigne. Progrès agricoles et viticoles 115 (3). p 59-65.
-

- CONG LINH L., 1987.** Multiplication végétative « *in vitro* » de la vigne *Vitis vinifera* L. Recher. Agr. Suisse. Vol 26 (4). p 507-517.
- CORBAZ R., 1990.** Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presses Polytechniques et Universitaires, Romande. 286 pages.
- CORNAGGIA D., 1985.** Régénération des arbres fruitiers par thermothérapie. INFO- CTIFL, N° 10. 17 pages.
- CORNUET P., 1987.** Éléments de virologie végétale. Ed. INRA, Paris. 206 pages.
- CORTE G.M., 1985.** Importance de la culture de méristèmes pour la multiplication accélérée de clone de vigne exempts de virus. Bulletin de l'OIV. p 396-702.
- CRESPY A., 1992.** Viticulture d'aujourd'hui : agriculture d'aujourd'hui : sciences, techniques, application. 2<sup>eme</sup> Ed, Tec et doc, Lavoisier. 180 pages.
- DESVIGNES J. C., BOVEY R., CORNAGGIA D., GRASSTNU N., 1990.** Maladies à virus, à mycoplasmes et à viroïdes des arbres fruitiers. CTIFL, Paris. 124 pages.
- D'KHILI B., GREANAN S., 1995.** Diagnostic rapide de la nécrose des nervures par la technique de microgreffage de tige *in vitro*. J. Intern. des Sciences de la Vigne et du Vin. France, N° 1. p 11-15.
- DUNEZ J., 1990 .** La production et la protection des arbres fruitiers à noyaux et de la vigne. Cours de virologie. IAM, Bari, Italie. 203 pages.
- DUNEZ J., 1996.** Lutte contre les maladies virales et utilisation de micro-organismes favorables. Phytoma. Défense des végétaux. p 30-32.
- ESMENJAUD D., 1983.** La dégénérescence infectieuse de la vigne (court noué) : transmission par le nématode *xiphinema index* et moyens de lutte. Progrès Agricoles et Viticoles 100. p 514-515.
- EVANS D.A., 1989.** Somaclonal variation: genetic basic and breeding application. Trends In Genetics N° 5. p 46-50.
- EYNARD I., 1990.** La viticulture dans le monde. Cours de Viticulture, IAM (Bari), Italie. 18 pages.
- FARETRA F., 1995.** Défense de la vigne des principaux champignons parasites Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes, IAM (Bari), Italie. 20 pages.
-

- FAVRE J.M., GREANAN S., 1973.** Sur la production de vrilles, de fleurs et de baies chez vigne cultivée in vitro. Ann. Amelio. Plant. 29. p 247-252.
- FAVRE J.M., 1977.** Premiers résultats concernant l'obtention *in vitro* de néoformations caulinaires chez la vigne. Ann. Amelio. Plantes 27 (2). p 151-169.
- FUCHS M., WALTER B., 1990.** Dépister les virus : le test Elisa. La vigne. p 39-40.
- FUCHS M., PINCK M., ETIENNE L., PINCK L., WALTER B., 1991.** Characterization and detection of grapevine fanleaf virus by using cDNA probes. Phytopathology 81. P 559-565.
- FOURNIOUX J.C., HELOIR M.C., 1999.** Micropropagation de la vigne et maîtrise de la fertilité. Progrès Agricoles et Viticoles 116 (7). p 115-160.
- FOX R.T.V., 1993.** Principle of diagnostic technique in plant pathology  
Chapitre 6: immunological for identification. P 129-139.  
Ed Cab. International. 213 pages.
- GALET P., 1977.** Les maladies et les parasites de la vigne.  
Tome 1 : les parasites dus à des végétaux (champignons, bactéries, viroses et phanérogames). Imp. Du paysan du Midi. Montpellier. 871pages.
- GALET P., 1983.** Précis de viticulture.  
Imp. Charle Dehan, 4<sup>ème</sup> Ed, Montpellier. 584 pages.
- GALET P., 1995.** Précis de pathologie viticole.  
2<sup>ème</sup> Ed, Impression J.F. 180 pages.
- GALZY R., 1961.** Confirmation de la nature virale du court noué de la vigne par des essais de thermothérapie sur des culture in vitro. C.R. Acad. Sci. Vol 2 N° 253. p 706- 708.
- GALZY R., 1963.** Thermothérapie de quelques variétés de vigne.  
Progrès Agricoles et Viticoles 80 (8). p 22-23.
- GALZY R., 1966.** Action de la température 35°C sur *Vitis rupestris* atteint de court noué. Bulletin Soc Fr Physiol Veg 12, p 391-399.
- GALZY R., 1969.** Remarque sur la croissance de *Vitis rupestris* cultivée in vitro sur différents milieux nutritifs. Vitis 8. p 191-205.
-

- GALZY R., 1971.** Recherche sur la croissance de la vigne saine et court nouée, première partie.  
Thèse Doct. Chaire de Génétique. C.R.A.M, INRA. Montpellier. 76 pages.
- GAUTHERET R.J., 1939.** Sur la possibilité de réaliser les cultures indéfinies des tissus de tubercules de carottes. C.R. Acad. Sci, 208. p118-129.
- GAUTHERET R.J., 1959.** la culture des tissus végétaux, techniques et réalisation.  
Ed. Masson et Cie, paris, 863 pages.
- GAUTIER M., 1993.** La culture fruitière.  
Vol 1, les productions des arbres fruitiers. Ed Lavoisier. 383 pages.
- GENTIT P., 2002.** Les apports de la biologie moléculaire en arboriculture fruitière : utilisation des outils moléculaires dans la détection des maladies de dégénérescence : le cas de la certification fruitière. 12<sup>ème</sup> Colloque sur les Recherches Fruitières, Bordeaux 30-31 mai.
- GIFFORT E.M., HEWITT W.B., 1961.** The use of heat therapy and *in vitro* shoot tip culture to eliminate fanleaf virus from the grapevine .  
Am J Enol Vitic 12, p 129-130.
- GILES G.L., VERHOYEN M., 1992.** Viroses et maladies apparentées des arbres fruitiers et ornementaux, assainissement et sélection. Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture, IRSIA, France. 166 pages.
- GIRARD M., HIRTH L., LEBEURIER G., WITZ J., 1989.** Virology moléculaire.  
Doin Edition. 617 pages.
- GOACOLOU J., PERDRIZET E., 1988.** Les semences du futur.  
Direction de l'Information et de la Communication de l'INRA. 8 pages
- GUGERLI P., BRUGGER J.-J., BOVEY R., 1984.** L'enroulement de la vigne: mise en évidence de particules virales et développement d'une méthode immuno- enzymatique pour le diagnostic rapide.  
Revue Suisse. Vitic. Arboric. Hortic. Vol 16 (5). p 299-304.
- GUGERLI P., BRUGGER J.J., BASLER P., 1990.** Dégénérescence infectieuse ou court noué de la vigne. Revue Suisse. Vitic. Arboric. Hortic. Vol 22 (1). p 33-48.
-

- GUGERLI P., BRUGGER J.J., RAMEL M.E., 1997.** Identification immunochimique du 6<sup>ème</sup> virus associé à la maladie de l'enroulement de la vigne et amélioration des techniques de diagnostic pour la sélection sanitaire en viticulture. Revue. Suisse. Vitic. Arboric. Hortic. Vol 29 (03). p 137-141.
- GRENAN S., 1980.** La thermothérapie un traitement contre les virus. La France Agricole. p 3-6.
- GRENAN S., 1983.** Conséquence de la culture *in vitro* de vitis vinifera. Vignes et Vins 316. p 11-15.
- HABERLANDT C., 1902.** culturversuche mit isolierten. Pflan Zenzellen Silzungsber. Akad. Wiss, Math. Nat. Class, 111. p 69-92.
- HABERT P., 1992.** Vignes et virus : la résistance s'organise : la lutte contre le court noué principale maladie virale de la vigne, passe par la création de plants résistants, plusieurs stratégies sont possibles. La recherche 247, vol : 23. p 1184-1186.
- HANIM N., 1991.** La sélection sanitaire et clonale de la culture de la vigne : sélection, diagnostic et assainissement. Cours de Guérison et Protection des Essences Fruitières Méditerranéennes (Bari), Italie. 21 pages.
- HARRIS R.E., STEVENSON J.H., 1982.** *In vitro* propagation of *vitis*. Vitis 21. p 22-32.
- HASSANI Z., BOUBALS D., 1991.** Le microgreffage *in vitro* : une technique rapide et efficace de révélation du virus de la nécrose des nervures de 110 R. Progrès Agricoles et Viticoles 108 (20). p 443-445.
- HELLER R., ESNAULT R., LANCE C., 1995.** Physiologie végétale. Tome 2 : développement. Ed Masson, Paris. 315 pages.
- HILL S.A., 1984.** Methods in plant pathology. Vol (1) Blackwell. Scientifientific Publications. 167 pages.
- HUGLIN P., 1986.** Biologie et écologie de la vigne. Ed. Payot, Lausanne. 371 pages.
- ITAFV., 2000.** Guide variétal de la vigne. Institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne. Ed. Écho Plus. Alger. 31 pages.
- JELLALLI M. H., 1996.** Contribution à l'amélioration des techniques de dépistage Et d'assainissement « *in vitro* » des viroses de la vigne en Tunisie Thèse Magister. INA. El Harrah. Algérie. 136p.
-

- KEDDAM M.A., 1995.** Methods de détection et moyens de lutte.  
Cours international avec l'OAD. 21 pages
- KERBOUA M., 1987.** Possibilités, techniques d'amélioration de la production de bois et des plants de vigne. Résumé de la thèse. 55 pages.
- LAFON J., COUILLAUD P., HUDE R., 1970.** Maladies et parasite de la vigne.  
Tome 2 : insectes, maladies no cryptogamiques et accidents.  
Ed. Bailliere J.B et Fils. Paris (VI). 324 pages.
- LAGHA M., 1992.** Caractérisation sérologique de trois souches du virus du court noué de la vigne (GFLV). Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes, Bari Italie. 54pages.
- LAHCENE S., 2003.** Contribution à l'amélioration des moyens de multiplication végétatives de Thuya de Berberie (*Tetraclinis articulata*. Vahl-Masters).  
Thèse. Magister, INA, Alger. 81 pages.
- LAMRATI A., EL KBIACH M.L., 2002.** Multiplication in vitro du chêne liège (*Quercus suber* L) par bourgeonnement axillaire.  
A/ influence des cytokinines sur l'organogénèse et la callogenèse de nœuds de plantules  
B/ influence des régulateurs de croissance sur la multiplication et l'enracinement.  
VIII<sup>ème</sup> Journées Scientifique du Réseau « Biotechnologie, Amélioration des Plantes et Sécurité Alimentaire ».  
Biotechnologie végétales et agriculture durable. p 183-215.
- LEBRUN L., 1985.** Amélioration de la vigne et culture *in vitro*.  
Biofutur 37. p 64-66.
- LEBTAHI F., 2001.** Contribution l'étude du sapin de Numidie (*Abies nimidica* de Lannoy): multiplication par semis et par culture *in vitro*.  
Thèse magister. Biologie végétale. ENS. 107 pages.
- LEGIN R., BASS P., VUITTENEZ A., 1979.** Premiers résultats de guérison par thermothérapie et culture *in vitro* d'une maladie de type cannelure produite par le greffage du cultivar servant de *Vitis vinifera* sur le porte greffe *Vitis riparia* x *V. berlandieri* Kober 5 BB. Comparaison avec diverses virose de la vigne. Phytopathol Medit 18, p 207-210.
- LEPOIVRE P., KUMMERT J., 1993.** Traité de pathologie végétale.  
Chapitre 11 : le diagnostic des maladies parasitaires. p361-379.  
Ouvrage collectif sous la direction de Jean Semal.  
Presse Agronomique de Gembloux. 621pages.
-

- LEPOIVRE P., SEMAL J., 1993.** Traité de pathologie végétale.  
Chapitre 16 : culture de tissus et phytopathologie, p455-464.  
Ouvrage collectif sous la direction de Jean Semal.  
Presse Agronomique de Gembloux. 621pages.
- LERCH B., 1977.** Inhibition of biosynthesis of potato virus X by ribavirin.  
Phyto.Z, vol 89. P 44-49.
- LEVADOUX L., BEN ABDERRABOU A., DOUAOURI B., 1971.** Ampélographie algérienne, cépage de cuve et de table cultivés en Algérie.  
Ed. SNED, Alger. 188 pages.
- LIMASSET P., CORNUET P., 1949.** Recherche de virus de la mosaïque du tabac dans les méristèmes des plantes infectées. C.R. Acad.Sci, 228.  
P 1971-1972.
- MARGARA J., 1989.** Bases de la multiplication végétatives : les méristèmes et l'organogénèse. INRA, Ed imprimerie Alençonnaise. 262 pages.
- MARTIN C., 1985.** Culture de méristèmes et multiplication végétatives *in vitro*.  
Symposium International sur la Culture In Vitro de Tissus Végétaux.  
8-15 dec. 5 pages.
- MARTIN C., COLLAS A., 1992.** De la culture in vitro à la production de greffes soudés issus du greffage herbacé de la vigne.  
Progrès Agricoles et Viticoles 109 (3). p 61-68.
- MARTINEZ M.R., MANTILLA J.L.G., 1994.** Comparative study of juvenility resulting from in vitro propagated *Vitis vinifera* L. Cv albarino vine. When subjected to different pruning systems. J. Int. Sci. Vigne. Vin 2. P 111-130.
- MARTELLI G.P., 1985.** Viroses et quasi viroses de la vigne en Algérie.  
Rapport gouvernement Algérien. F.A.O. Rome. 42 pages.
- MARTELLI G.P., SAVINO V., 1990.** Fanleaf degeneration, compendium of grape diseases. The American Phytopathologie, Calif, Society, Second Printed.  
P 48-49.
- MARTELLI G.P., 1992.** Les maladies infectieuses de la vigne: nature, détection, guérison et situation dans les pays arabes. Cours de virologie végétale, IAM. Bari. Italie. 20 pages.
- MARTELLI G.P., 1994.** Classification systématique des virus de la vigne.  
Institut Agronomique Méditerranéen (IAM), Bari- Italie. 20 pages.
-

- MARTELLI G.P., 1995.** Clostérovirus et maladies de la vigne : révision de la situation actuelle et possible ligne de recherche fruitière. Institut Agronomique Méditerranéen (IAM), Bari- Italie. 26 pages.
- MAURO M.C., TOUTAIN S., DELOIRE A., 1994.** Quel avenir pour l'amélioration des plants de vignes transgéniques obtenus par embryogenèse somatique. Ed. AUPELF-URFF, Paris. P 501-505.
- MINAFRA A., HADIDI A., 1994.** Sensitive detection of grapevine virus A, B and leafroll associated III from viruliferous naelybug and infected tissue by DNA amplification. J. Virol Methods, 47. P 175-188.
- MONCOUSIN C., 1991.** Rooting of microcutting: unmanipulated factors. Acta. Hort 289. P 319-327.
- MONETTE P.C., 1986.** Elimination in vitro of two grapevine nepovirus by an alternating temperature regime. J. Phytopathology, 116. p 88-91.
- MOREL G., 1944.** Sur le développement de tissus de vignes cultivés *in vitro*. C.R. Acad. Séance Biol. Paris. p 138-162.
- MOREL G., MARTIN C., 1952.** Guérison de pomme de terres atteintes de maladies à virus. CR. Acad. Agro. Fr, 41. P 432-475.
- MORSLI D., 1990.** Sélection sanitaire de la vigne : principes et applications. Rapport de stage pratique, Institut Agronomique Méditerranéen (IAM), Bari. Italie. 30 pages.
- MORSLI D., 1995.** Évaluation sanitaire du vignoble et identification par voie biologique et sérologique d'un isolat du court noué à partir d'une variété autochtone. Thèse Magister, INA, Alger. 87 pages.
- MULLINS M.G., SRINIVASAN C., 1976.** Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv Cabernet-Sauvignon) by apomixes *in vitro*. J. of Experimental Botany 27, p1022-1030.
- MUR G., 1979.** Thermothérapie des variétés de vitis vinifera par la méthode de la culture *in vitro*. Progrès Agricoles et Viticoles, 96. p 148-151.
- MURASHISE T., SKOOG F., 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15. p 473-497.
- NAVARRO L., ROISTACHER C.N., MURASHISHGE T., 1975.** Improvement of shoot tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. J. Am. Soc. Hort. Sci. 100. P 471-479.
-

- NAVARRO L., JUAREZ J., 1977.** Elimination of citrus pathogens in propagative bud wood *in vitro* propagation. Proc. Int. Soc. Citriculture , vol 3. p 349-360.
- NOZERAN R., BANCILHON L., 1972.** Les cultures *in vitro* en tant que technique pour l'approche de problèmes posés par l'amélioration des plantes. Ann. Amelio. Plantes, 22 (2). p167-185.
- OUERFELLI R., 1990.** Relation entre clostérovirus et tissus de vigne en fonction de leur détection. Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes, Bari- Italie. 55 pages.
- POOL R.M., 1975.** Effect of cytokinin on *in vitro* development of Concord flowers. Am J Enol Vitic 26, p 43-46.
- RAJNCHAPEL A., GUERCHE PH., 1985.** Méthodes *in vitro* et productions végétales. Biofutur octobre, 1985. p 31-43.
- REGNER F., BRANT S., ROMANN A., STADHUBER A., 1995.** Élimination des virus de la vigne *in vitro*. Mitteilunger, Reb and Wein, Autriche. N° 3. p 67-74.
- REYNIER A., 1986.** Manuel de viticulture. 4<sup>ème</sup> Ed, J.B, Bailliére. 365 pages.
- REYNIER A., 1991.** Manuel de viticulture. 6<sup>ème</sup> Ed Tec et Doc, Lavoisier. 403 pages.
- RIBA G., 2001.** Le débat sur les organismes génétiquement modifiés (OGM) vigne : historique des recherches sur les vignes transgéniques à l'INRA. Progrès Agricoles et Viticoles 118 (19). p 417-422.
- RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1971.** Traité d'ampélographie : sciences et technique de la vigne. Tome 1 : biologie de la vigne, sols de vignobles. Ed.Dunod. Paris. 725 p
- RIVES M., 1971.** Traité d'ampélographie, sciences et techniques de la vigne. Tome II : culture, pathologie, défense sanitaire de la vigne. Chapitre 6 : maladies à virus de la vigne. Ed .Dunod. Paris. p 399-430.
- ROBBE DURAND P., FOUGEROUX A., BEYT N., 1990.** Guide pratique de défense des cultures, reconnaissance des ennemies, notion des cultures. 4<sup>ème</sup> Ed. Association de Coordination Technique Agricole. Acta. 557pages.
- ROBBINS W.J., 1922.** Cultivation of excised root tips and stem tip under sterile conditions. Bot. Gaz, 73. P 376-390.
-

- ROSCIGLIONE B., CASTELLANO M.A., MARTELLI G.P., SAVINO V., CANNIZARO G., 1983.** Mealybug transmission of grapevine virus a Vitis 22. P 331-347.
- RYSER P., BASLER P., 1990.** Carence en éléments majeurs et oligo-éléments sur vigne. Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic. Vol 22 (1). p 39-42.
- SEMADI A., BOURDJIBA O., 2002.** Caractérisation et comportement de cinq cépages de vigne autochtones (essai dans le n.e algérien). P 249-250. VIII journées scientifiques- auf- marrakach, 7-9 octobre : Biotechnologie végétales : valorisation pour une agriculture durable. Thème : les outils biotechnologiques à des cultures d'importance socio- économique.
- SEMAL J., 1993.** Traité de pathologie végétale.  
Chapitre 12 : règles générales de lute contre les maladies des plantes, p 381- 387. Ouvrage collectif sous la direction de Jean Semal.  
Presse agronomique de Gembloux. 621pages.
- SEMAL J., VANDERVEKEN J., 1993.** Traité de pathologie végétale.  
Chapitre 9 : modalités de transmission de phytovirus, p 303-321.  
Ouvrage collectif sous la direction de Jean Semal.  
Presse agronomique de Gembloux. 621pages.
- SKOOG F., MILLER C., 1956.** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Sym. Soc. Exp. Biol, 9. P 118-131.
- SPIRE D., 1988.** Impact et condition de développement des nouvelles techniques de diagnostic in le repérage précoce des maladies.  
Ann. Coll. APRIA. Paris, 20-21 janvier. p 1-41.
- STATISTIQUE AGRICOLE., 2002.** Statistiques agricoles.  
série B, Ministère d'agriculture et de la pêche, direction des statistiques agricoles et des enquêtes économiques. 43 pages
- TANNE E., SHLAMOVITO N., SPIEGEL-ROYL P., 1993.** Rapidely diagnosing corky-bark by *in vitro* microgrfting. Hort Science 28 (6). P 667-668.
- TANNE E., SPIEGEL ROY P., SHLMOVI N., 1996.** Rapid *in vitro* indexing of grapevine viral disease. Plant Disease Vol 80 (8). p 972-974.
- TORREGROSA L., BONNET A., TORREGROSA A., BOUBALS D., 2000.** Une nouvelle forme symptomatologique du court noué de la vigne. Qui a vu cela ? Progrès agricoles et viticoles, 117 (22), spécial vinitech. p488-490.
-

- VALAT C., GREANAN S., AURAN G., BONNET A., 1979.** Guérison de quelques maladies à virus de la vigne par thérapie de plantules cultivées *in vitro*. Vigne et Vin 284. p 19-22.
- VIDEAU J., CHARMONT S., WAGNER R., 1993.** Le raisin de table. CTIFEL, Ed Tec et Doc, Lavoisier. 263 pages.
- VUITTENEZ A., LEGIN R., KUSZALA J., CARDIN-MUNK M.C., 1972.** Les virus "népo" chez la vigne et leurs nématodes vecteurs. Ann. Phytopathol 4 (4). p 373-392.
- VUITTENEZ A., 1974.** Tests virologiques et régénération par thérapie : deux voies complémentaires pour la production de plants de vigne sans virus. Colloque International de la Multiplication de la Vigne, Dijon.
- VUITTENEZ A., 1984.** Inventaire des virus et maladies de type viral étudiées en France colmar. Symp. Intern. Sur le Stockage et la Conservation des Virus et des Eaux de Vie d'Origine Vinicole. Toulouse, France. 9-10-11-12-13 dec. P 497-502.
- WALKER N., DUMAS E., FRANCLLET A., BEKKAOUI F., 1985.** Technique de culture *in vitro* des méristèmes de *Sequoia sempervirens* et *Pinus pinaster*. Ann. De Recherche Sylvicoles. A.f.O.C.E.L. p 87-109.
- WALTER B., VUITTENEZ A., KUZALA J., STOCKY G., BURCKARD J., VAN REGENMORTEL MARC H.V., 1984.** Détection sérologique des virus du court noué de la vigne par le test Elisa. Agronomie 4(6). p 527-534.
- WALTER B., 1988.** Quelques exemples de la réaction physiologique de la vigne en présence de virus. Bulletin de l'OIV, (687-688). p 383-390.
- WALTER B., BASS P., LEGIN R., MARTIN C., VERNROY R., COLLAS A., VESSELLE G., 1990.** The use of a green grafting technique for the detection of virus like diseases of the grapevine. J. Phytopathology 128. p 137-145.
- WALTER B., DEMANGEAT G., 1994.** Les virus du court noué de la vigne : avantage et limites de la détection par Elisa. Progrès Agricoles et Viticoles N° 13-14. p 320-328.
- WALTER B., 1996.** Lutte contre les virus du court noué de la vigne: objectif résistance. Phytoma. La défense des végétaux N° 486. p 33-35.
- WALTER B., CLOQUEMIN G., CLAUDEL J.M., 1996.** Les maladies à virus et phytoplasmes de la vigne. Analyse et Diagnostic N° 5, p 1-2.
-

- WALTER B., MARTELLI G.P., 1996.** Sélection clonale de la vigne : sélection sanitaire et sélection pomologique : influence des viroses et qualité. 1<sup>ère</sup> partie : effets des viroses sur la culture de la vigne. Bulletin de l'OIV. p 946-971.
- WALTER B. 1998.** Virus et viroses de la vigne : diagnostic et méthodes de lutte. Revue Virologie Vol 2, N°6. p 435-444.
- WALTER B., BOUDON PADIEU E., RIDE M., 2000.** Les maladies à virus, bactéries et phytoplasmes de la vigne. Ed Féret. 175 pages.
- WHITE PH. R., 1934.** Potentially unlimited growth of excised tomato root tip in a liquid medium. Plant Physiology, 9. P 585-600.
- ZIMMERMANN D., WALTER B., LEGALL O., 1988.** Purification de particules virales associées à l'enroulement de la vigne et mise au point d'un protocole Elisa permettant leur détection. Agronomie 8 (8). p 731-741.
- ZOU C.J., LI P.F. 1981.** Induction of pollen plants of grape (*Vitis vinifera* L.). ACTA Bot Sin 23, p 79-81.
- ZRYD J.P., GAZEAU M., DERREUDRE J., MONNIE R., 1988.** Culture de cellules, tissus et organes végétaux : fondements théoriques et utilisation pratiques. Presses Polytechniques, Romande. p 307 pages.
-

## **1/DETECTION DES VIROSES**

### **1.1/Observation directe des symptômes**

#### **1.1.1/ Symptômes du court noué**

##### **❖ Au vignoble**

Au cours des prospections du vignoble, nous avons noté une gamme étendue de symptômes du court noué sur les variétés Ahmar bou amar et Valensi :

Sur les feuilles, différentes déformations sont notées: limbes asymétriques et gaufrés avec dentelure aiguë des bords et sinus pétiolaire élargi ; des taches jaunes sous forme d'anneaux chlorotiques sont également observé (Figure: 32).

Sur les rameaux, présence d'entre-nœuds courts et double nœuds (Figure : 33 et 34), avec un développement en zigzag, accompagné aussi de bifurcation anormale en dichotomie et fasciation des rameaux (Figure : 35 et 36).

Chez la variété Muscat de Cherrhell, aucun symptôme attribué à cette maladie n'a été observé.

##### **❖ Sous serre**

Sur les variétés Ahmar bou amar et Valensi des feuilles asymétriques sont observées (Figure : 37), avec dentelures aiguës des bords ; des feuilles gaufrées et découpées sont également rencontrées (Figure : 38).

Sur les rameaux, présence des entre nœuds courts (figure : 39) accompagnés d'un développement en zigzag.

Chez Muscat de Cherrhell, aucun symptôme de court noué n'a été révélé.

#### **1.1.2/ Symptômes de la marbrure**

##### **❖ Au vignoble**

Les prospections effectuées au vignoble sur les trois variétés n'ont révélé aucun symptôme accordé à cette maladie.

##### **❖ Sous serre**

Sur les variétés Ahmar bou amar et Valensi, les plants montrent des éclaircissements des nervures des feuilles du sommet (figure : 40), accompagnés par un enroulement des feuilles vers la face supérieure (forme de gouttière) (figure : 41, 42 et 43).

Chez Muscat de Cherrhell, les symptômes de la marbrure ne sont pas observés.

#### **1.1.3/ Symptômes de l'enroulement foliaire**

##### **❖ Au vignoble**

La symptomatologie au vignoble de Benchicao, sur la variété Ahmar bou amar et la variété Valensi n'a révélé aucun symptôme d'enroulement foliaire.

Chez Muscat de Cherrhell, nous avons noté un jaunissement des feuilles accompagné d'enroulement vers la face inférieure.

##### **❖ Sous serre**

Aucun symptôme d'enroulement foliaire n'a été observé sur les trois variétés de vigne.



**Figure 32 : feuilles asymétriques, dentelure aigue des bords, (variété Ahmarbou amar) (x 0.3)**



**Figure 33 : entre nœuds courts (variété Ahmar bou amar) (x 0.2)**



**Figure 34 : double nœud (variété Valensi) (x 0.2)**



**Figure 35 : fasciation et bifurcation anormale (variété Ahmar bou amar) (x 0.2)**



**Figure 36 : bifurcation anormale et entre nœuds courts (variété Valensi) (x 0.15)**



**Figure 37 : asymétrie des feuilles (variété Valensi) (x 0.25)**



**Figure 38 : feuille asymétrique et déformée (variété Ahmar bou amar) (x 0.2)**



**Figure 39 : développement en zigzag (variété Ahmar bou amar) (x 0.2)**

**Figure 32 – 39 : symptômes du court noué observés au vignoble et sous serre sur les variétés Ahmar bou amar et Valensi**



**Figure 40 : éclaircissement des nervures (variété Ahmar bou amar) (x 0.25)**



**Figure 41 : enroulement des feuilles vers la face supérieure (variété ahmar bou amar) (x 0.15)**



**Figure 42 : enroulement des feuilles vers la face supérieure (variété Valensi) (x 0.15)**



**Figure 43 : enroulement des feuilles vers la face supérieure et développement en zigzag (variété Ahmar bou amar) (x 0.15)**

**Figure 40-43 : symptômes de la marbrure observés au vignoble et sous serre sur les variétés Ahmar bou amar et Valensi**

Les symptômes caractéristiques du court noué observés sous serre sur les variétés Ahmar bou amar et Valensi confirment les résultats obtenus au vignoble.

Pour la marbrure, des réponses positives sont notées sous serre pour les variétés Ahmar bou amar et Valensi. Cependant, l'absence de la marbrure au vignoble confirme les travaux de BOVEY (1992) qui signale la latence de ce virus sur les variétés de vigne.

Concernant l'enroulement foliaire, l'absence des symptômes au vignoble chez les variétés Ahmar bou amar et Valensi peut se traduire par la période des prospections (mois de juin), alors que les symptômes d'enroulement se manifestent mieux en automne.

Chez Muscat de Cherchell, les symptômes de l'enroulement foliaire ne sont pas bien visibles sous serre par rapport à ce qui a été enregistré au vignoble.

Il ressort de tous les résultats obtenus que certains vignobles algériens sont dans un état sanitaire inquiétant vis à vis des maladies virales. En effet, les résultats recueillis dans ce diagnostic visuel concernant le court noué confirment les travaux de BENCHIHA (1976) dans la région de Mostaganem et de BOUSALEM (1981) dans les pépinières viticoles de Chebli et Khemis El Khachna sur les variétés de Dattier de Beyrouth, Sultanine, Italia et Valensi.

MARTELLI (1985) rapporte que la dégénérescence infectieuse est présente dans tous les vignobles algériens sur plusieurs variétés de table (Ahmar bou amar, Muscat d'Alexandrie), de cuve (Alicante bouchet, Cinsaut, Carignan) et de porte greffes (41B, 99R et SO4).

En 1995, MORSLI a mis en évidence le virus du court noué dans plusieurs régions du pays (Médéa, Mascara, Boumerdes et Tipaza) sur différentes variétés de vigne : Ahmar bou amar, Dattier de Beyrouth, Muscat d'Alexandrie et Valensi ; et de porte greffes : 41B et 99R.

De même, AMEDJKOUH (1999) a révélé la présence du court noué dans la pépinière du GDSP située à El Harrach, sur la variété du Dattier de Beyrouth en enregistrant un taux d'infection de 90.62%.

La symptomatologie ou le diagnostic visuel constitue la première étape de l'évaluation sanitaire au vignoble ; cependant la latence de certains virus empêche la manifestation des symptômes tels que l'enroulement foliaire qui a été révélé au vignoble de Cherchell sur la variété de Muscat de Cherchell et dont les symptômes n'ont pas été nets sous serre.

Cela nous a conduit à passer à une deuxième méthode de détection des virus : l'inoculation mécanique sur des indicateurs herbacés.

**1.2/ Indexage par inoculation mécanique sur indicateurs herbacés**

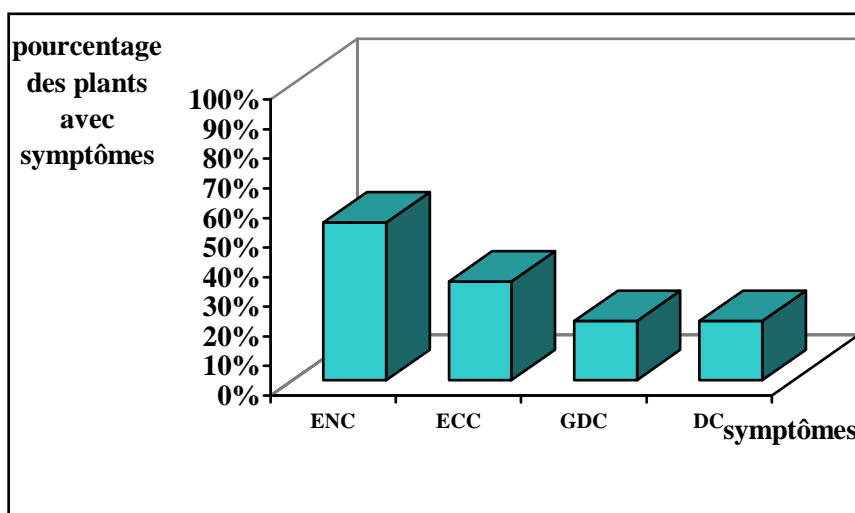
Après inoculation mécanique effectuée sur la gamme d’hôtes herbacés, divers symptômes sont apparus sur les trois espèces utilisées (la courgette, la tomate et le petit pois).

Les symptômes sont apparus après trois jours pour la tomate et le petit pois et six jours pour la courgette.

Les observations ont porté sur la nature des symptômes apparus et le pourcentage des plantes atteintes quinze jours après l’inoculation (Tableau : 12) et (Figure 44 et 45).

**Tableau 12 : pourcentage des plantes indicatrices présentant des symptômes extériorisés**

Symptômes		Pourcentage des plants avec symptômes		
		La courgette	La tomate	Le petit pois
Enroulement des cotylédons	(ENC)	53,33 %	/	/
Eclaircissement des cotylédons	(ECC)	33,33 %	/	/
Gaufrage et Dessèchement des cotylédons	(GDC)	20 %	/	/
Déformations des cotylédons	(DC)	20 %	/	/
Enroulement des feuilles	(EF)	86,66 %	53,33 %	0 %
Eclaircissement des feuilles	(ECF)	73,33 %	0 %	0 %
Asymétrie des feuilles	(AF)	40 %	80 %	0 %
Gaufrage et Dessèchement des feuilles	(GDF)	0 %	73,33 %	0 %
Nanismes	(N)	53,33 %	0 %	0 %
Flétrissement des feuilles	(FF)	46,66 %	73,33 %	100 %
Déformation des feuilles	(DF)	6,66 %	33,33 %	0 %
Taches nécrotiques des feuilles	(TNF)	0 %	80 %	53,33 %



**Figure 44 : histogramme des différents symptômes induits par le virus GLRaV sur les feuilles cotylédonaires, chez la courgette.**

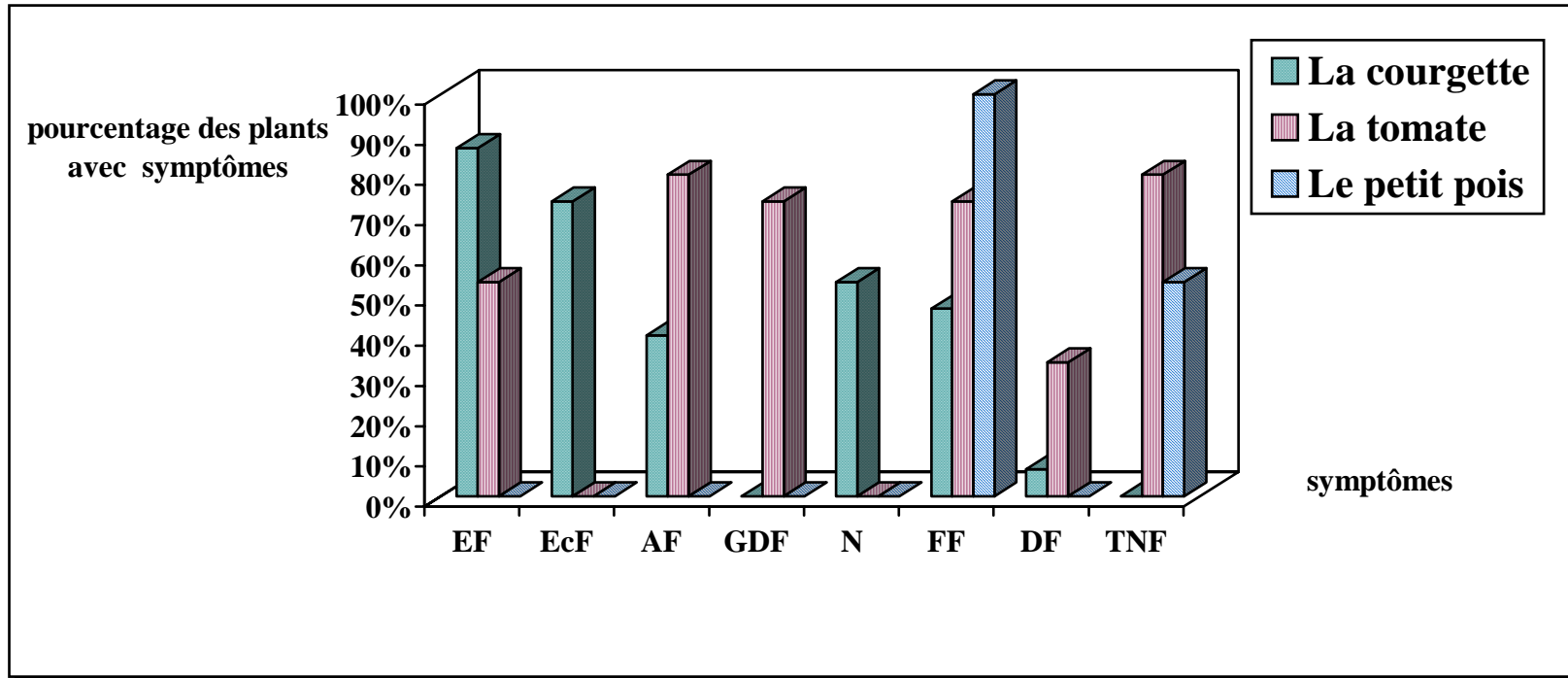


Figure 45 : histogramme des différents symptômes induits par le virus GLRaV sur les feuilles, chez les trois espèces indicatrices.

Ces résultats préliminaires montrent que les trois espèces inoculées (la courgette, la tomate et le petit pois) réagissent différemment à la présence du virus ; cela nous a permis de les classer selon leur sensibilité et selon l'importance des symptômes.

Sur la courgette (figure : 46 et 47), le virus a provoqué des symptômes à des taux considérables : la moyenne des symptômes à la fois de l'enroulement et de l'éclaircissement des feuilles cotylédonaires (43,33 %), celle des feuilles (80 %) et le nanisme (53,33 %).

Pour la tomate (figure : 48), le virus a induit des symptômes à des taux très élevés : taches nécrotiques (80 %), asymétrie des feuilles (80 %), gaufrage et dessèchement des feuilles (73,33 %) et flétrissement des feuilles (73,33 %).

Sur le petit pois (figure : 49), le virus ne se manifeste que par deux symptômes mais avec des taux très élevés : flétrissement des feuilles à 100 % et taches nécrotiques des feuilles à 53,33 %.

D'après les symptômes extériorisés sur les trois espèces indicatrices, le virus correspond au GLRaV.

Après avoir évalué les symptômes induits par le virus de l'enroulement foliaire sur les plants testés, nous avons calculé les moyennes globales des pourcentages des symptômes ; ainsi, nous avons constaté que la tomate et le petit pois sont plus sensibles et réagissent à la présence du virus avec des taux considérables respectivement 76,6 % et 65,55 %, mais avec peu de symptômes pour le petit pois .

Mais d'après la diversité et l'intensité des symptômes, nous avons remarqué que la courgette réagit mieux à la présence du virus avec un taux moyen des symptômes de 43,33 %

Ces résultats obtenus par l'inoculation mécanique nous ont permis de déduire que l'enroulement des feuilles qui est le symptôme typique du GLRaV et qui se manifeste avec un taux très élevé chez la courgette (86,66 %), classe cette dernière comme meilleure plante indicatrice.

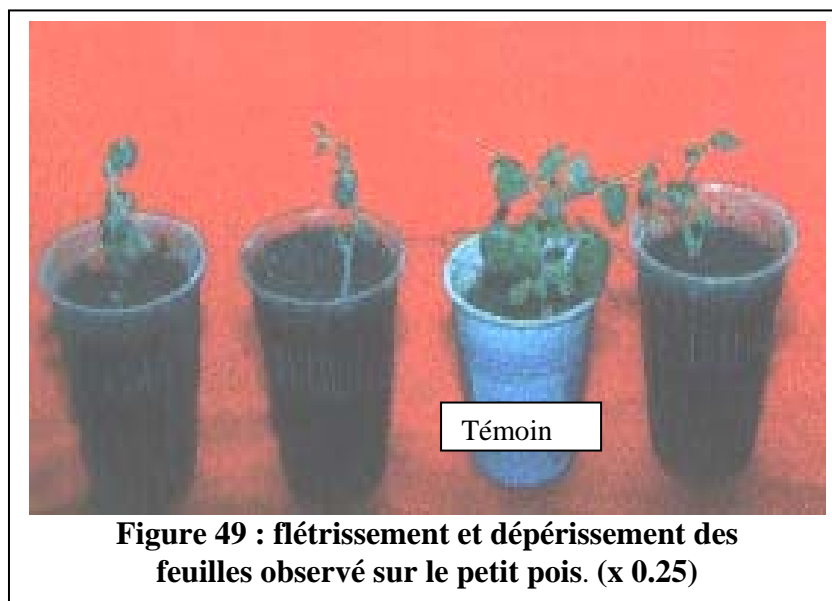
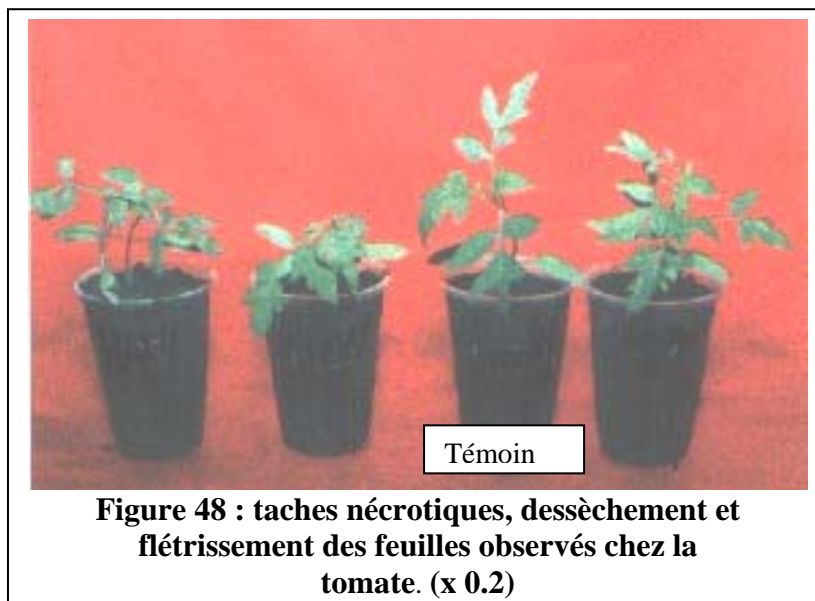
---



**Figure 46 : enroulement des feuilles cotylédonaires, enroulement des feuilles, taches chlorotiques et nanisme observés chez la courgette. (x 0.16)**



**Figure 47 : enroulement des feuilles cotylédonaires et des feuilles de la courgette (x 0.16)**



**1.3/ Méthode sérologique : résultats du test Elisa**

**1.3.1/ résultat du test Elisa pour les trois variétés de vigne**

Le résultat du test Elisa pour les trois variétés de vigne : Ahmar bou amar, Valensi et Muscat de Cherehell sont regroupés dans le Tableau 13.

**Tableau 13 : résultats du test de dépistage « Elisa » pour les trois variétés de vigne**

Virus du court noué (GFLV)			Virus de la marbrure (GFKV)	
Variétés de vigne	Densité optique	réaction	Densité optique	réaction
Ahmar bou amar	- 0.006	+	- 0.070	+
Témoin positif	- 0.089	+	- 0.104	+
Témoin négatif	- 0.212	-	- 0.216	-
Valensi	0.390	+	- 0.168	+
Témoin positif	- 0.089	+	- 0.104	+
Témoin négatif	- 0.212	-	- 0.216	-
Muscat de Cherehell	- 0.109	-	- 0.106	-
Témoin positif	0.207	+	- 0.050	+
Témoin négatif	- 0.096	-	- 0.101	-
Virus de l'enroulement foliaire (GLRVaI)			Virus de l'enroulement foliaire (GLRaV III)	
Variétés de vigne	Densité optique	réaction	Densité optique	réaction
Ahmar bou amar	- 0.212	-	- 0.219	-
Témoin positif	- 0.094	+	- 0.140	+
Témoin négatif	- 0.208	-	- 0.211	-
Valensi	- 0.216	-	- 0.213	-
Témoin positif	- 0.094	+	- 0.140	+
Témoin négatif	- 0.208	-	- 0.211	-
Muscat de Cherehell	- 0.106	-	0.187	+
Témoin positif	0.208	+	0.100	+
Témoin négatif	- 0.056	-	- 0.090	-

Il ressort de ces tableaux que les variétés Ahmar bou amar et Valensi réagissent positivement vis à vis du virus du court noué (GFLV) et de la marbrure (GFKV) ; et négativement pour le virus de l'enroulement foliaire (GLRaV I et GLRaV III).

Par contre, la variété Muscat de Cherehell a réagit positivement pour le virus de l'enroulement (GLRaV III) et ne montre aucune réaction positive vis à vis du (GFLV, GFKV et GLRaV I).

Le résultat du test Elisa nous a permis de confirmer les observations visuelles au vignoble et sous serre ; ce test nous a même révélé la présence du virus de l'enroulement foliaire (GLRaV III) chez la variété Muscat de Cherehell, bien quelle n'ait pas extériorisé des symptômes d'enroulement foliaire sous serre.

### 1.3.2/ Résultat du test Elisa pour les plantes indicatrices :

Le résultat du test Elisa pour les trois espèces indicatrices : la courgette, la tomate et le petit pois sont regroupés dans le Tableau 14.

**Tableau 14 : résultats du test de dépistage « Elisa » pour les plantes indicatrices**

Virus de l'enroulement foliaire (GLRaV I)			Virus de l'enroulement foliaire (GLRaV III)		
Variétés	Densité optique	réaction	Variétés	Densité optique	réaction
Témoin positif	0,194	+	Témoin positif	0,197	+
la courgette	0,138	-	la courgette	0,206	+
Témoin négatif	0,165	-	Témoin négatif	0,167	-
La tomate	0,129	-	La tomate	0,203	+
Témoin négatif	0,169	-	Témoin négatif	0,148	-
le petit pois	0,125	-	le petit pois	0,177	+
Témoin négatif	0,138	-	Témoin négatif	0,155	-

Les densités optiques obtenues par le test Elisa nous ont permis de comparer les résultats à ceux obtenus par l'inoculation mécanique.

Les trois espèces : la courgette, la tomate et le petit pois ont réagi négativement vis à vis du GLRaV I et positivement vis à vis du GLRaV III. Ces résultats confirment aussi ceux obtenus par le test Elisa sur la variété Muscat de Cherrhell.

Ainsi, l'observation visuelle, l'inoculation mécanique sur indicateurs herbacés et le test Elisa sur la variété Muscat de Cherrhell et sur les espèces indicatrices ont révélé que la variété Muscat de Cherrhell est atteinte du virus de l'enroulement foliaire (GLRaV III).

**2/ ASSAINISSEMENT ET REGENERATION PAR CULTURE *IN VITRO*  
DE MERISTEMES**

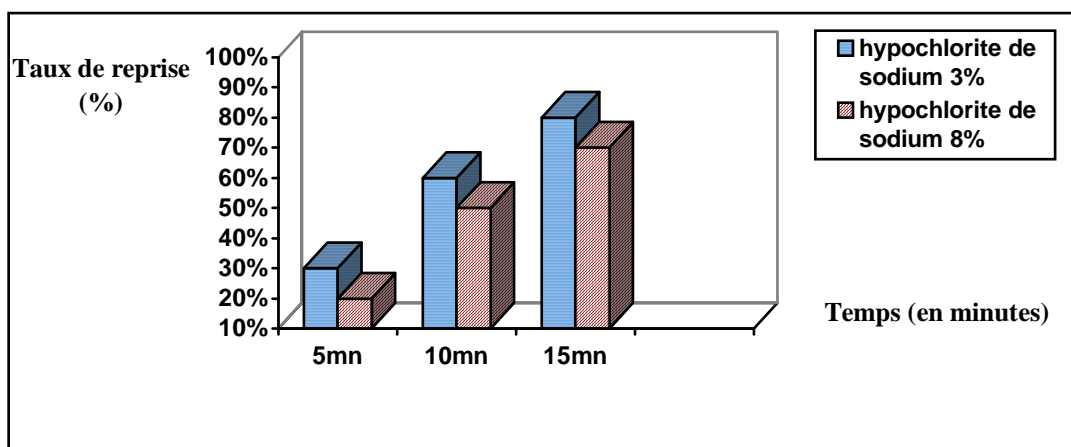
**2.1/ La phase d'initiation et de croissance**

**2.1.1/ Stérilisation du matériel végétal**

Les résultats obtenus sont illustrés par le tableau 15 et 16 ; et les figures 50 et 51 qui montrent l'effet des solutions stérilisantes sur, à la fois l'état sanitaire et la reprise des méristèmes.

**Tableau 15 : influence de la durée de stérilisation et de la concentration de l'hypochlorite de sodium sur la reprise de croissance des méristèmes introduits *in vitro*.**

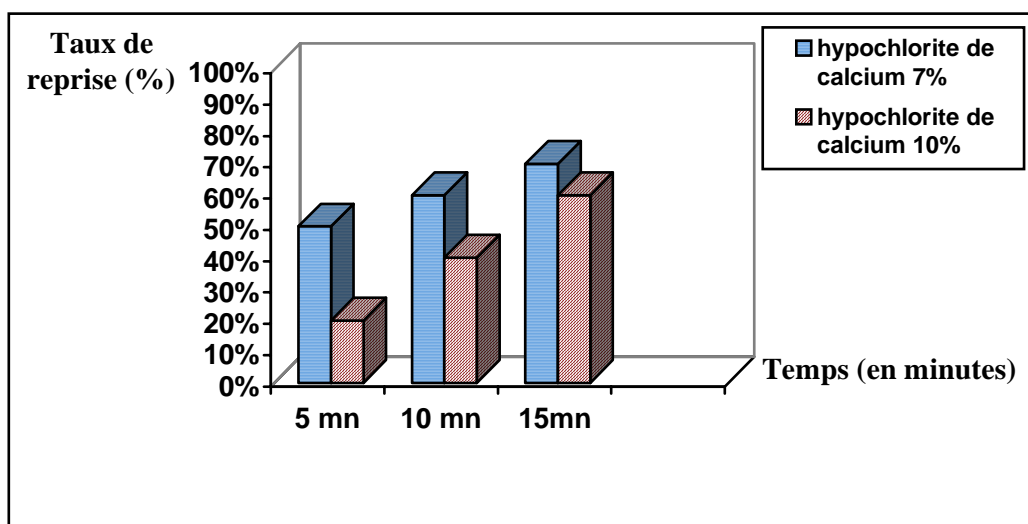
Méthodes de désinfection	Temps de désinfection	Nombre de méristèmes mis en culture	Nombre de méristèmes contaminés	Nombre de méristèmes desséchés	Nombre de méristèmes en croissance	Taux de reprise
Hypochlorite de sodium (NaOCl) 3%	5mn	10	0	7	3	30%
	10mn	10	0	4	6	60%
	15mn	10	0	2	8	80%
Hypochlorite de sodium (NaOCl) 8%	5mn	10	0	8	2	20%
	10mn	10	0	5	5	50%
	15mn	10	0	3	7	70%



**Figure 50 : effet de l'hypochlorite de sodium à différentes concentrations et à des temps de trempage variables sur le taux de reprise des méristèmes.**

**Tableau 16 : influence de la durée de stérilisation et de la concentration de l'hypochlorite de calcium sur la reprise de croissance des méristèmes introduits *in vitro*.**

Méthodes de désinfection	Temps de désinfection	Nombre de méristèmes mis en culture	Nombre de méristèmes contaminés	Nombre de méristèmes desséchés	Nombre de méristèmes en croissance	Taux de reprise
Hypochlorite de calcium Ca (OCl) <sub>2</sub> 7%	5mn	10	0	5	5	50%
	10mn	10	1	3	6	60%
	15mn	10	0	3	7	70%
Hypochlorite de calcium Ca (OCl) <sub>2</sub> 10%	5mn	10	0	8	2	20%
	10mn	10	0	6	4	40%
	15mn	10	0	4	6	60%



**Figure 51 : effet de l'hypochlorite de calcium à différentes concentrations et à des temps de trempage variables sur le taux de reprise des méristèmes.**

Chez la plupart des cultures d'organes, la stérilisation consiste à éliminer de l'explant les germes (champignons et bactéries) qui lui sont liés.

Dans le cadre de notre expérimentation, nous avons testé l'effet de deux solutions désinfectantes à des concentrations différentes et à des temps de trempage variable.

La désinfection à base d'hypochlorite de sodium à 3 % et 8 % pendant 5, 10 et 15 minutes révèle l'absence de contamination quelle que soit la concentration d'hypochlorite de sodium et la durée de temps de trempage.

Pour la désinfection à base d'hypochlorite de calcium à 7 % et 10 % pendant 5, 10 et 15 minutes, elle montre un faible taux de contamination (10 % en utilisant l'hypochlorite de calcium à 7 % pendant 10 minutes) ; cette contamination peut avoir une relation avec les conditions de travail ou le milieu de culture d'autant plus que nous n'avons pas repéré d'autres contaminations quelle que soit la concentration d'hypochlorite de calcium et la durée de temps de trempage.

Par contre, nous constatons un dessèchement des méristèmes en diminuant le temps de trempage des pousses végétatives et en augmentant la concentration d'hypochlorite de sodium. Ainsi, 70% des méristèmes se dessèchent en utilisant l'hypochlorite de sodium à 3 % pendant 5 minutes et 80% des méristèmes se dessèchent en utilisant l'hypochlorite de sodium à 8 % pendant 5 minutes

De même une augmentation de la concentration d'hypochlorite de calcium et une diminution du temps de trempage : 10% pendant 5 minutes) provoque aussi un dessèchement de 80% des méristèmes.

Certains auteurs (BOCCON-GIBOD, 1989) ont favorisé l'utilisation de l'hypochlorite de calcium, car il ne pénètre pas dans les tissus, contrairement à l'hypochlorite de sodium où les ions de sodium peuvent dans certains cas gêner la croissance d'où la nécrose des cellules.

Selon BENIN et al. (1988), la vigne est parmi les espèces ayant dans leurs tissus des quantités importantes des produits phénoliques de type orthophénols et les tannins. Ces composés sont considérés comme des antagonistes aux substances de croissance et inhibiteurs des réactions métaboliques.

D'après MARGARA (1989), le brunissement de l'explant du à l'excrétion des composés phénoliques provoque une inhibition de la croissance. Ce phénomène est assez souvent rencontré, en particulier avec les ligneux.

La présence de ces composés dans la vigne peut expliquer en partie la nécrose de nos explants.

Pour notre étude, nous avons obtenu 70 % de reprise en utilisant l'hypochlorite de calcium à 7 % pendant 15 minutes. Cependant l'hypochlorite de calcium étant peu stable, son utilisation doit être immédiate après sa préparation. De ce fait, dans le cadre de notre expérimentation, c'est l'hypochlorite de sodium à 3 % et à une durée de temps de 15 minutes qui nous apporte satisfaction (80% de reprise).

En effet, selon (BOCCON-GIBOD, 1989), du fait que les méristèmes sont entourés par les ébauches foliaires, ils ne nécessitent pas des méthodes de stérilisation trop lourdes.

Ces résultats concordent avec ceux de CARRE et al (1979) sur framboisier qui montre que le méristème suffisamment protégé par des ébauches foliaires est naturellement stérile.

Dans la même optique, les travaux de WALKER et al (1985) sur le *Sequoia sempervirens*, montrent que la culture de méristème même sans désinfection des pousses permet l'obtention de plants non contaminés.

### 2.1.2/ Type d'explants méristématiques utilisé

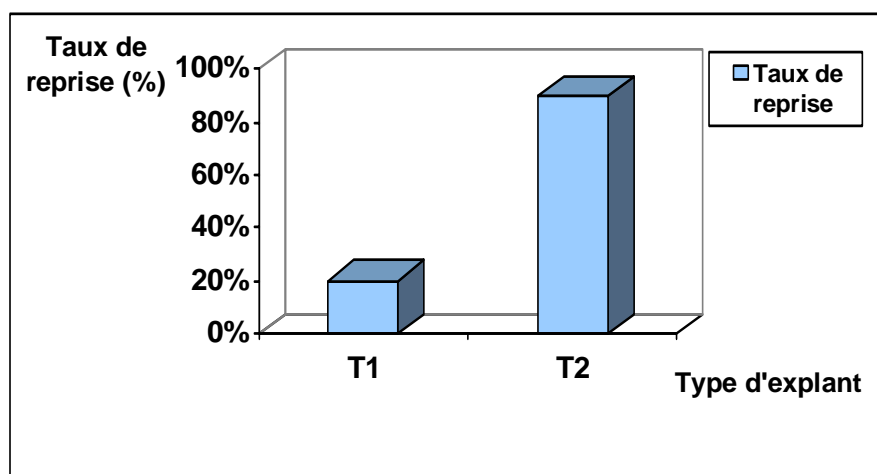
Deux semaines après la mise en culture des méristèmes dans le milieu d'initiation (MS<sub>2</sub>), nous obtenons les résultats illustrés dans le tableau 06 et la figure 21.

**Tableau 17 : structure des méristèmes prélevés.**

TYPE D'EXPLANTS	NOMBRE DE MERISTEMES MIS EN CULTURE	NOMBRE DE MERISTEMES DESSECHES	NOMBRE DE MERISTEMES REPRIS	TAUX DE REPRISE
T <sub>1</sub>	20	16	4	20 %
T <sub>2</sub>	20	2	18	90 %

T<sub>1</sub> = dôme apical sans primordia foliaire.

T<sub>2</sub> = dôme apical avec les deux dernières primordia foliaires



**Figure 52 : effet du type d'explant utilisé sur le taux de reprise**

D'après l'analyse du tableau 17, la culture *in vitro* du dôme apical sans primordia foliaire (T<sub>1</sub>) a connu un échec. Ainsi 80% des méristèmes se dessèchent et se nécrosent. Par contre la culture *in vitro* du dôme apical avec les dernières primordia foliaire (T<sub>2</sub>) a permis la croissance des méristèmes avec un taux de réussite de 90 %.

D'après MARGARA (1989), le terme culture de méristèmes devrait s'appliquer à la culture du dôme apical lui-même ou à la rigueur à celle du méristème pourvu de quelque primordiums foliaires.

Selon GALZY (1972), les méristèmes de vigne prélevés avec deux mrimordia foliaires correspondent à une taille de 0.2 mm environ et présentent les dimensions habituellement requise pour la culture de méristèmes pratiquée dans le but d'obtenir des plants indemnes de virus à partir de clones virosés.

Nos résultats sont en accord avec ceux de JELLALI (1996). Selon cet auteur, le dessèchement des méristèmes de la vigne de type T<sub>1</sub> est dû aux blessures du dôme apical par les instruments de dissection ; cependant, la présence des deux primordia foliaire protège le dôme apical contre ces blessures.

L'étude de la relation « taille méristématique- assainissement viral » établit par BEN ABDALLAH et al (1996) sur la vigne a démontré que seuls les méristèmes de taille comprise entre 0.1 et 0.5 mm se sont avérés pertinents pour la production des plants sains à partir de microgreffage d'apex de vigne.

Chez les Citrus, l'utilisation des méristèmes de 0.1 mm et ayant au maximum deux primordia foliaires donne un taux de réussite de 100% (NAVARRO et JUARZ, 1977). Selon les mêmes auteurs, chez le pêcher l'utilisation des méristèmes de 0.4-0.8 mm a permis d'éliminer 72% des virus ; en outre, le nombre de plants indemnes de virus est proportionnel à la taille des méristèmes (REGNER et al., 1995).

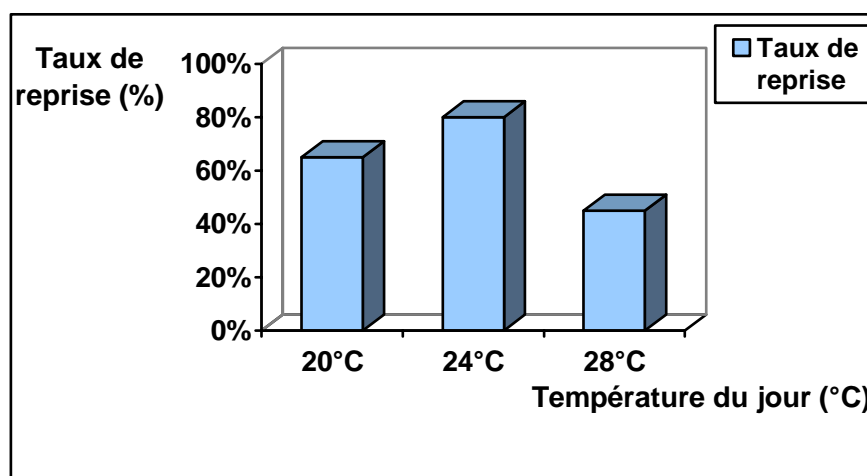
A l'issu de tous ces résultats, nous avons retenu pour le reste de notre expérimentation, la culture de méristème T<sub>2</sub>, c'est le même type utilisé par GALZY (1972), BENABDALLAH (1996) et JELLALI (1996).

### 2.1.3/ Influence de la température du jour

Dans le tableau 19 sont portés les résultats de l'effet de la température du jour sur la croissance des méristèmes.

**Tableau 19 : influence de la température du jour sur la croissance des méristèmes**

Température	Nombre de méristèmes mis en culture	Temps de reprise	Nombre de méristèmes nécrosés	Nombre de méristèmes repris	Taux de reprise
20°C	20	4 semaines	7	13	65%
24°C	20	20 jours	4	16	80%
28°C	20	10 jours	11	9	45%



**Figure 54 : effet de la température du jour sur la reprise des méristèmes**

Le tableau 19 et la figure 54 font ressortir que les méristèmes qui séjournent à la température de 20°C montrent un arrêt de croissance et un développement très lent qui atteint 65% après 4 semaines de mise en culture dans le milieu d'initiation.

Placés à la température de 24°C, 80% des méristèmes acquièrent un développement très rapide qui permet leur transfert dans un milieu neuf.

A la température 28°C, 55% des méristèmes mis en culture se nécrosent au bout de dix jours.

Dans le cadre de notre recherche, nous avons opté pour la température 24°C. Cette température est considérée comme la meilleure pour les méristèmes de la vigne et c'est la même température utilisée par JELLALI (1996).

## 2.1.5/ Influence de la concentration en substances de croissance

### 2.1.5.1/Milieu MURASHIGE et SKOOG (1962).

Les taux de reprise des méristèmes sur le milieu d'initiation (MS 62) en fonction de la concentration des régulateurs de croissance sont regroupés dans le tableau 20.

**Tableau 20 : influence de la concentration des régulateurs de croissance dans le milieu de base MS (62).**

Variétés	Milieux de culture	Nombre de méristème mis en culture	Temps de reprise	Nombre de méristèmes desséchés	Nombre de méristèmes formant un cal	Nombre de méristèmes repris	Taux de reprise
Ahmar bou amar	MS <sub>0</sub>	10	1 MOIS	9	0	1	10%
	MS <sub>1</sub>	20	25 JOURS	5	0	15	75%
	MS <sub>2</sub>	20	20 JOURS	3	0	17	85%
	MS <sub>3</sub>	20	20 JOURS	4	7	9	45%
Valensi	MS <sub>1</sub>	20	25 JOURS	6	0	14	70%
	MS <sub>2</sub>	20	20 JOURS	3	0	17	85%
	MS <sub>3</sub>	20	20 JOURS	3	9	8	40%
Muscat de Cherchell	MS <sub>1</sub>	20	25 JOURS	7	0	13	65%
	MS <sub>2</sub>	20	20 JOURS	4	0	16	80%
	MS <sub>3</sub>	20	20 JOURS	2	10	8	40%

MS<sub>0</sub> : Milieu sans hormones (témoin)

MS<sub>1</sub> : 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP

MS<sub>2</sub> : 1.5mg.L<sup>-1</sup> BAP

MS<sub>3</sub> : 1.5 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0.2 mg.L<sup>-1</sup> ANA

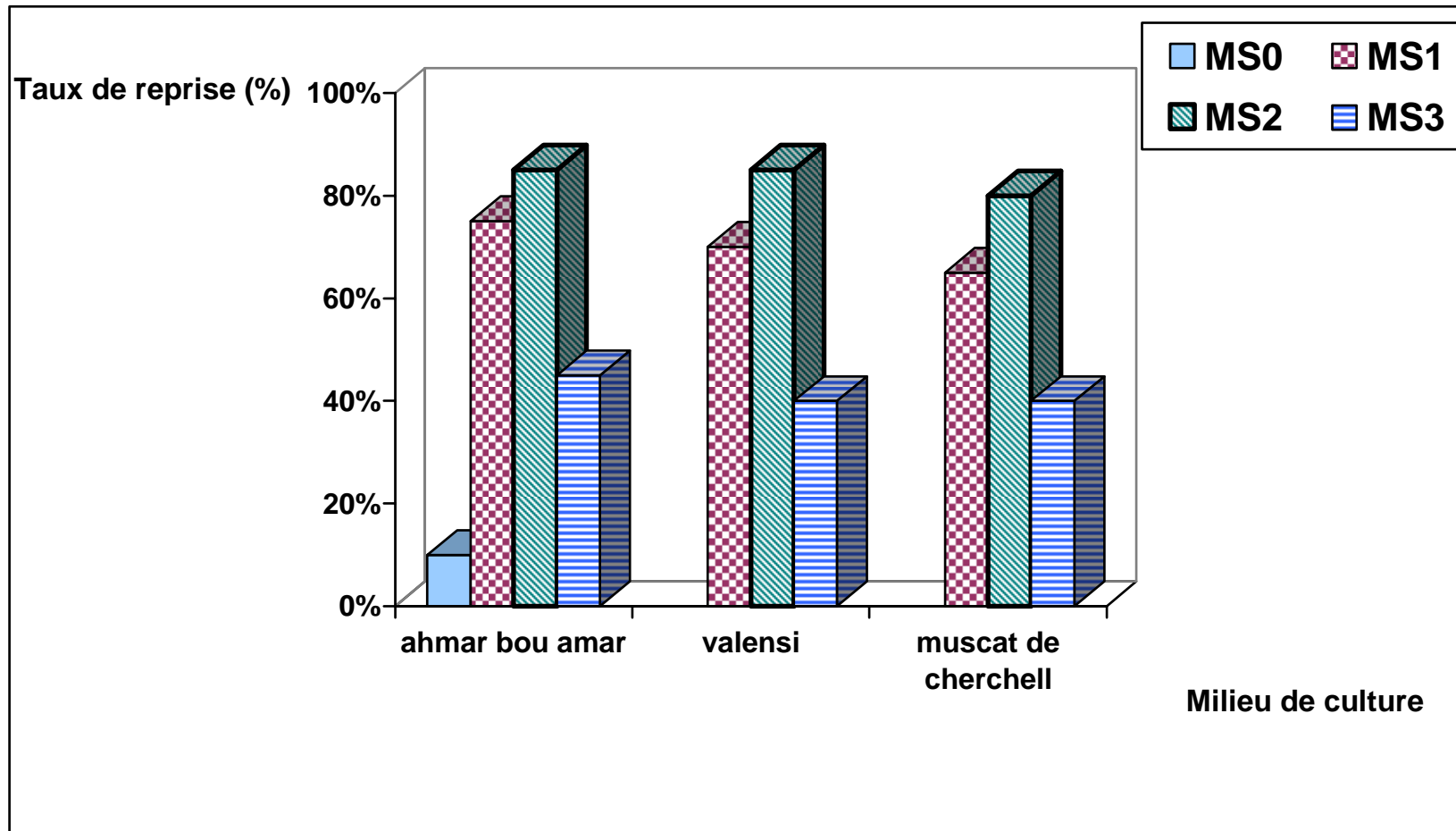


Figure 55: taux de reprise des méristèmes en fonction de la concentration des régulateurs de croissance dans le milieu de base MS (62).

Sur le milieu dépourvu de régulateurs de croissance ( $MS_0$ ), les méristèmes ne montre aucun développement. Seuls 10 % restent sous forme d'un point vert après un mois de mise en culture.

Cultivés sur  $MS_1$  ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP), la croissance des méristèmes montre un retard de 10 jours par rapport à ceux cultivés dans le milieu  $MS_2$  ( $1.5 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP) avec un taux de reprise de 75% pour la variété Ahmar bou amar, 70% pour Valensi et 65% pour Muscat de Cherchell.

Dix jours après la mise en culture, les méristèmes placés sur  $MS_2$  présentent une croissance homogène (absence de callogenèse) avec un taux de croissance considérable ; 85% pour Ahmar bou amar et Valensi et 80% pour Muscat de Cherchell.

Une semaine après la mise en culture des méristèmes sur  $MS_3$  ( $1.5 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP +  $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$  ANA), un début de croissance est observé s'accompagnant de la formation de cal, Ce milieu diffère des précédents par l'apport supplémentaire en auxine : l'ANA à raison de  $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$ , c'est pourquoi nous constatons des taux de callogenèse importants : 35% pour la variété Ahmar bou amar, 45% pour Valensi et 50% pour Muscat de Cherchell ; en même temps, le taux de croissance reste faible pour les trois variétés de vigne : 45% pour Ahmar bou amar et 40% pour Valensi et Muscat de Cherchell.

### 2.1.5.2/ Milieu CHEE et POOL (1987).

Les taux de reprise des méristèmes sur le milieu d'initiation CP (87) en fonction de la concentration des régulateurs de croissance sont regroupés dans le tableau 21.

**Tableau 21 : influence de la concentration des régulateurs de croissance dans le milieu de base CP (87).**

VARIETES	Milieux de culture	Nombre de méristèmes mis en culture	Temps de reprise	Nombre de méristèmes desséchés	Nombre de méristèmes formant un cal	Nombre de méristèmes repris	Taux de reprise
Ahmar bou amar	$CP_0$	10	1 MOIS	10	0	0	0%
	$CP_1$	20	25 JOURS	5	0	15	75%
	$CP_2$	20	15 JOURS	3	0	17	85%
	$CP_3$	20	20 JOURS	3	7	10	50%
Valensi	$CP_1$	20	25 JOURS	5	0	15	75%
	$CP_2$	20	15 JOURS	2	0	18	90%
	$CP_3$	20	20 JOURS	6	6	8	40%
Muscat de Cherchell	$CP_1$	20	25 JOURS	7	0	13	65%
	$CP_2$	20	15 JOURS	3	0	17	85%
	$CP_3$	20	20 JOURS	6	5	9	45%

$CP_0$  : Milieu sans hormones (témoin)

$CP_1$  :  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP

$CP_2$  :  $1.5 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP

$CP_3$  :  $1.5 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP +  $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$  ANA

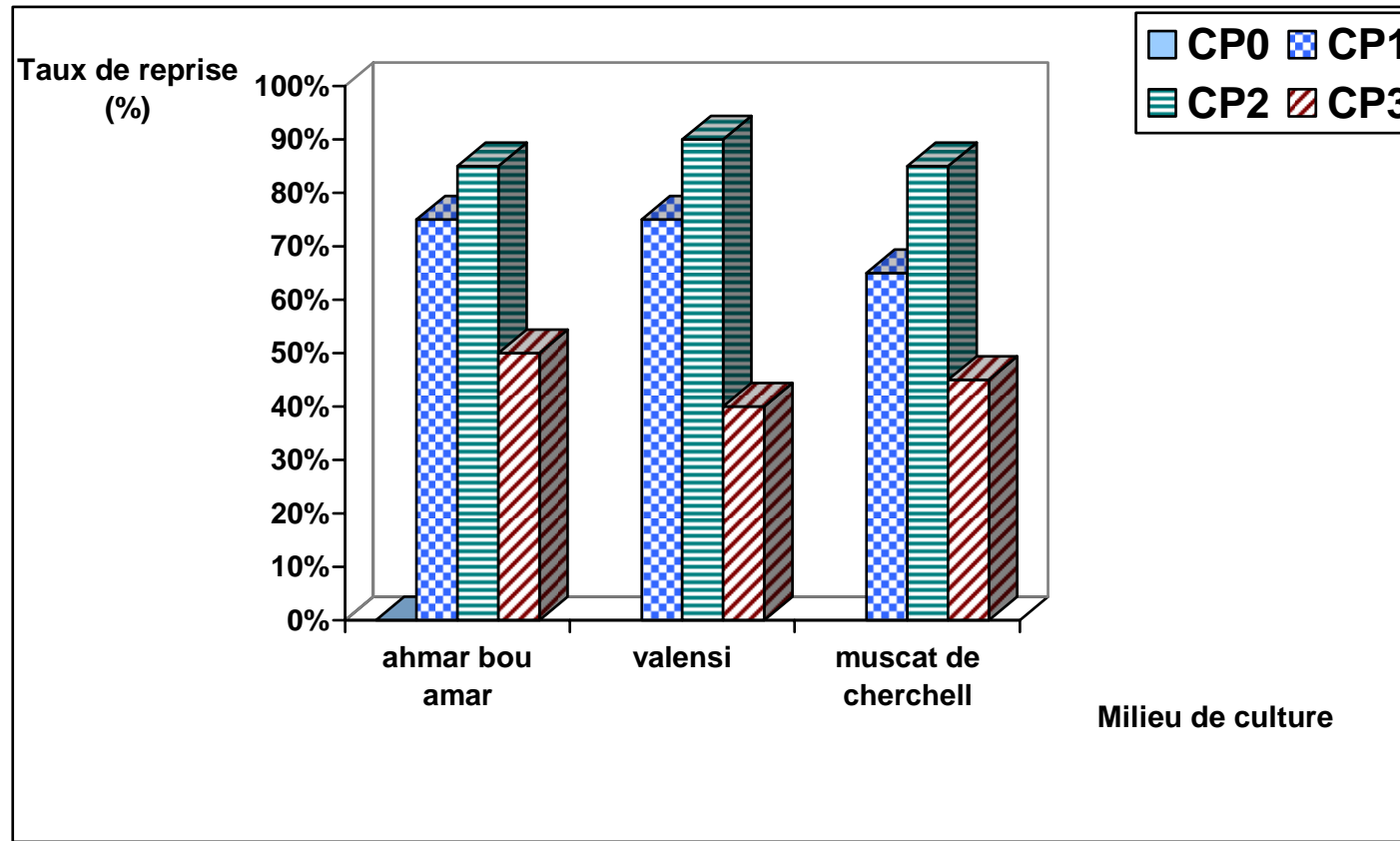


Figure 56: taux de reprise des méristèmes en fonction de la concentration des régulateurs de croissance dans le milieu de base CP (87).

Sur le milieu dépourvu de régulateurs de croissance CP<sub>0</sub>, les méristèmes se transforment en un point vert et après un mois de mise en culture ils se dessèchent.

Cultivés sur le milieu CP<sub>1</sub> (1mg.L<sup>-1</sup> BAP), les méristèmes présentent une faible croissance et après 20 jours de mise en culture le taux de reprise atteint 75% pour les variétés Ahmar bou amar et valensi et 65% pour la variété Muscat de Cherchell.

Après 5 à 6 jours de mise en culture sur le milieu CP<sub>2</sub> (1.5 mg.L<sup>-1</sup> BAP) les méristèmes se développent rapidement et après deux semaines une croissance très importante est remarquée avec un taux de reprise de 85% pour Ahmar bou amar et Muscat de Cherchell et 90% pour Valensi.

Les méristèmes placés sur le milieu CP<sub>3</sub> (1.5 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0.2 mg.L<sup>-1</sup> ANA) présentent une faible croissance avec formation de cal ; ainsi les taux de reprise enregistrés sont de 50% pour Ahmar bou amar, 40% pour Valensi et 45% pour Muscat de Cherchell. De plus, les taux de callogenèse sont de 35% pour Ahmar bou amar, 30% pour Valensi et 25% pour Muscat de Cherchell.

Les résultats consignés dans le tableau 20 et 21 montrent que l'absence de régulateurs de croissance ne favorise pas le développement des méristèmes. En effet toute cellule végétale est capable de synthétiser des cytokinines mais de manière insuffisante pour sa propre croissance (ZRYD et al., 1988).

L'examen des résultats montre l'aptitude des méristèmes à se développer est influencée par la concentration en BAP. De bon résultats ont été obtenus avec de 1.5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 85% dans le milieu MS<sub>2</sub> et 90% pour le milieu CP<sub>2</sub>

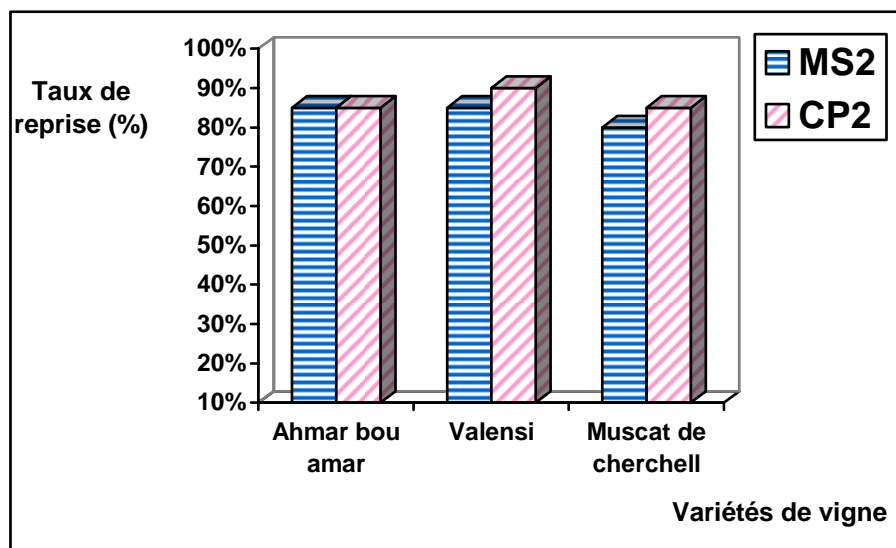
Nos résultats confirment les observations faites par BARLASS et SKENE (1978) qui ont fait mention de l'effet bénéfique de l'utilisation de la BAP sur la croissance des méristèmes de la vigne. Par ailleurs le phénomène de la callogenèse induit par l'adjonction de 0.2 mg.L<sup>-1</sup> de l'ANA à la BAP a été observé par JELLALI (1996).

### 2.1.6/ Influence des milieux de base sur la croissance des méristèmes

Les résultats de l'étude comparative entre les deux milieux de base MS (62) et CP (87) sont portés sur le tableau 22.

**Tableau 22 : étude comparative entre les milieux de base d'initiation MS (62) et CP (87).**

VARIETES	Milieux de culture	Nombre de méristèmes mis en culture	Temps de reprise	Nombre de méristèmes desséchés	Nombre de méristèmes repris	Taux de reprise
Ahmar bou amar	MS <sub>2</sub>	20	20 jours	3	17	85%
	CP <sub>2</sub>	20	15 jours	3	17	85%
Valensi	MS <sub>2</sub>	20	20 jours	3	17	85%
	CP <sub>2</sub>	20	15 jours	2	18	90%
Muscat de Cherchell	MS <sub>2</sub>	20	20 jours	4	16	80%
	CP <sub>2</sub>	20	15 jours	3	17	85%



**Figure 57 : étude comparative entre les milieux de base MS (62) et CP (87) et leur influence sur le taux de croissance des méristèmes.**

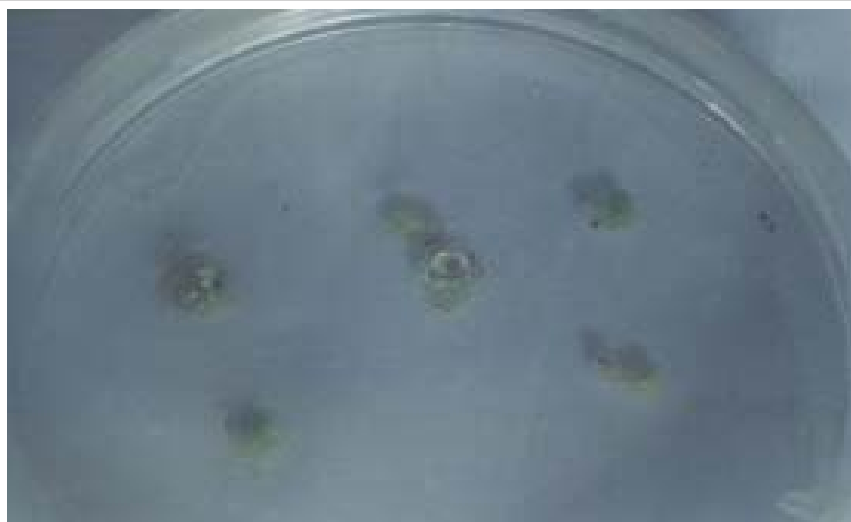
L'examen des résultats des Tableaux 20 et 21 montre que l'aptitude des méristèmes à se développer est influencée par la concentration en BAP. De bons résultats ont été obtenus avec  $1.5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP où nous enregistrons un taux de reprise de 85% dans le milieu  $\text{MS}_2$  et un taux de reprise de 90% dans le milieu  $\text{CP}_2$  (Figure : 59, 60 et 61). Ces résultats nous ont amené à faire une étude comparative des deux milieux de base  $\text{MS}_2$  et  $\text{CP}_2$  (Tableau 22).

#### ❖ CONCLUSION

Au cours de cette première étape nous avons retenu les premiers résultats :

- Méthode de désinfection du matériel végétal : hypochlorite de sodium à 3% pendant 5 Mn.
- Méthode de prélèvement du méristème:  $T_2$  (dôme apical avec deux primordia foliaires).
- Température du jour :  $24^\circ\text{C}$ .
- Milieu de culture de base :  $\text{CP}_2$  avec  $1.5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP.

Ainsi, les autres milieux ont été abandonnés dans le reste de notre étude.



**Figure 58 : croissance des méristèmes de la variété Ahmar bou amar cultivés sur le milieu MS2 après un séjour de 20 jours. (x 1.5)**



**Figure 59 : croissance des méristèmes de la variété Ahmar bou amar cultivés sur le milieu CP2 après un séjour de 15 jours.(x 1.5)**



**Figure 60 : croissance des méristèmes de la variété Ahmar bou amar cultivés sur le milieu CP2 après un séjour de 20 jours. (x 2)**

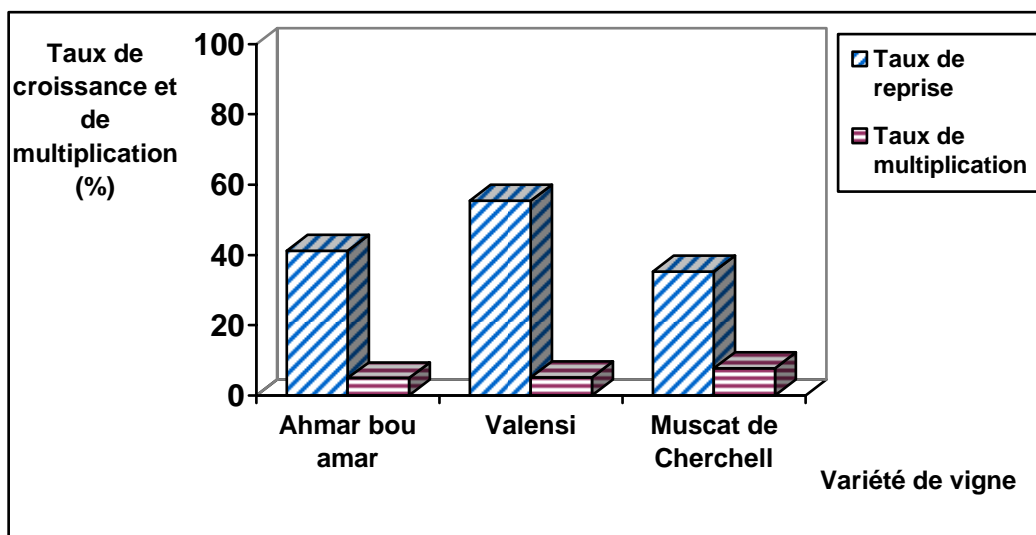
## 2.2/ La phase de multiplication

Après un séjour d'un mois dans le milieu d'initiation, les explants obtenus sont transplantés dans le milieu de multiplication CP (87) modifié, pour cela nous avons pensé à diminuer de 1/3 la concentration des macro-éléments et nous avons remplacé les vitamines de CP par les vitamines de MOREL et MARTIN (1952) qui sont très riches.

Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau 23.

**Tableau 23 : résultats obtenus en milieu de culture de multiplication.**

VARIETES	Nombre de méristèmes en croissance	Nombre de méristèmes contaminés	Nombre de méristèmes repris	Taux de reprise	Nombre de bourgeons néoformés	taux de multiplication
Ahmar bou amar	17	10	7	41.17%	35	500
Valensi	17	7	10	55.5%	52	520
Muscat de Cherchel	17	11	6	35.29%	47	780



**Figure 61 : effet du milieu de multiplication sur le taux de reprise et le taux de multiplication**

Concernant la variété Ahmar bou amar, les 17 méristèmes issus du milieu d'initiation ont été transplantés dans le milieu de multiplication. Après 3 à 4 semaines tous les méristèmes non contaminés se développent en produisant une feuille bien apparente au dessous de laquelle il est possible d'observer la présence de 4 à 5 bourgeons adventifs. Ces bourgeons repiqués dans leur milieu neuf donnent des tiges feuillées au sein desquelles apparaissent de nouveaux 4 à 5 bourgeons (Figure 62 et 63).

Théoriquement il est possible d'obtenir 500 plants par méristème au bout de 3 à 4 subcultures. Mais vu les problèmes rencontrés durant l'été 2003 dus à la forte chaleur et les coupures successives d'électricité, la nécrose des plants et la propagation d'une bactérie a causé une perte considérable des plants obtenus.

Ainsi à partir de 17 méristèmes de la variété Ahmar bou amar, 35 plants sont obtenus à partir de 7 méristèmes non contaminés avec un taux de reprise de 41.17% et un taux de multiplication de 5 % (Figure 61).

Chez la variété Valensi, la taux de multiplication était de 5.2 % ; ainsi à partir de 17 méristèmes issus du milieu d'initiation, 55.5% ont donné 52 pousses (Figure 61).

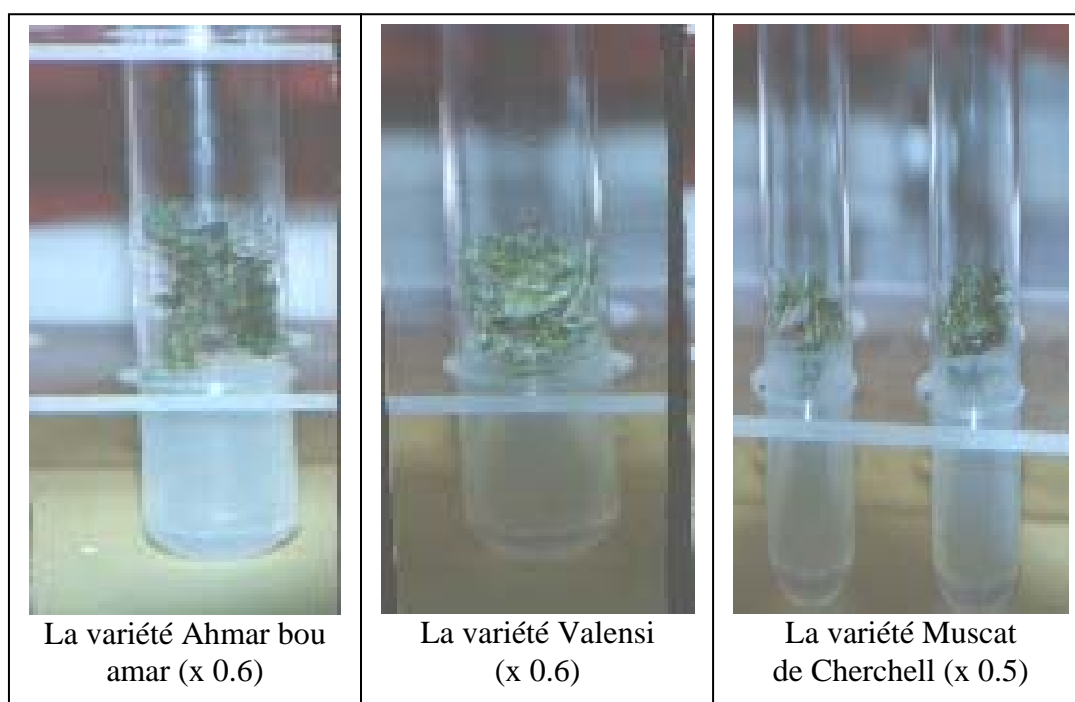
Chez Muscat de Charchell, parmi les 17 méristèmes issus du milieu d'initiation, 35.29% ont évolué pour donner 47 plants avec un taux de multiplication de 7.8% (Figure 61).

### **2.2.1/ Effet du génotype sur le taux de multiplication**

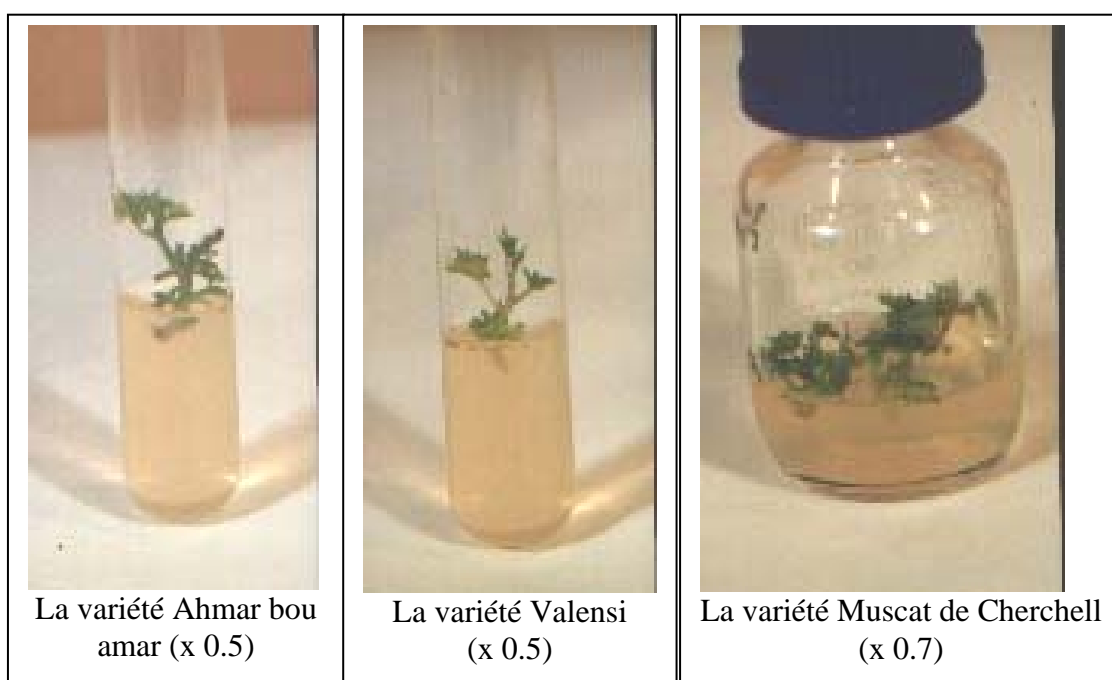
Les résultats obtenus montre que la variété Muscat de Charchell donne les meilleurs résultats avec un taux de multiplication de 7.8% suivie par les variétés Valensi et Ahmar bou amar dont le taux de multiplication est de 5%.

Cependant nous avons observé une différence de comportement des variétés aux stades d'initiation et de multiplication. Ainsi le stade d'initiation a favorisé la croissance de la variété Valensi avec un taux de croissance de 90% suivie des deux variétés Ahmar bou amar et Muscat de Charchell avec un taux de croissance de 85%.

Selon CORTE (1985), la différence de comportement des plants de vigne cultivé in vitro est liée à l'origine des méristèmes prélevés.



**Figure 62 : vitroplants des trois variétés obtenus au cours de la phase de multiplication**



**Figure 63 : 1<sup>ère</sup> subculture des vitroplants des trois variétés issus de la phase de multiplication**

### 2.3/ Phase d'allongement et d'enracinement

Le milieu d'allongement utilisé l'hormone d'allongement GA<sub>3</sub> à une concentration de 1mg.L<sup>-1</sup>.

Après 3 semaines de séjour dans le milieu d'allongement, les plants évoluent très bien pour atteindre une longueur de 2 à 3 cm, et à la fin de la 3<sup>ème</sup> semaine, nous avons remarqué un début de formation des racines.

Au bout de deux semaines, les explants s'allongent pour atteindre 7 à 8 cm de longueur avec formation de 5 à 6 feuilles accompagné d'un développement intense du système racinaire jusqu'à 8 cm de longueur et qui atteint à la fin de la 3<sup>ème</sup> semaine 20 cm (Figure 64 et 65).

Selon MONCOUSIN (1991), l'enracinement *in vitro* peut être affecté par la composition minérale du milieu de milieu de multiplication et la nature de la source de carbone.

Par ailleurs, de nombreux auteurs montrent qu'un séjour des explants de vigne à l'obscurité est favorable à l'apparition et au développement des racines CONG LINH (1987) ; (LEBTAHI, 2001) sur le sapin de Numidie et (LAHCENE, 2003) sur le Thuya de Berberie ; cependant, durant notre expérimentation les racines ont été obtenues sans le passage par la phase d'obscurité.

Certains auteurs (GALZY, 1972 ; ZRYD et al, 1988) confirment que l'adjonction de l'hormone d'allongement GA<sub>3</sub> inhibe la formation des racines ; nos résultats sont en désaccord avec ces observations. En effet nous avons réussi à obtenir des racines bien développées pendant la phase d'allongement dont le milieu contient l'hormone d'allongement GA<sub>3</sub> (0.1 mg.L<sup>-1</sup>).

Au cours de la phase d'allongement et d'enracinement, les vitroplants obtenus ne produisent pas de vrille, cette observation est déjà signalée par FOURNIOUX et HELOIR (1999).

Selon NOZERAN et BANCILHON (1972) chez les *Vitis*, les caractères juvéniles concernant l'absence de vrille se maintiennent au cours des repiquages successifs *in vitro* et même pendant quelque temps après le repotage.

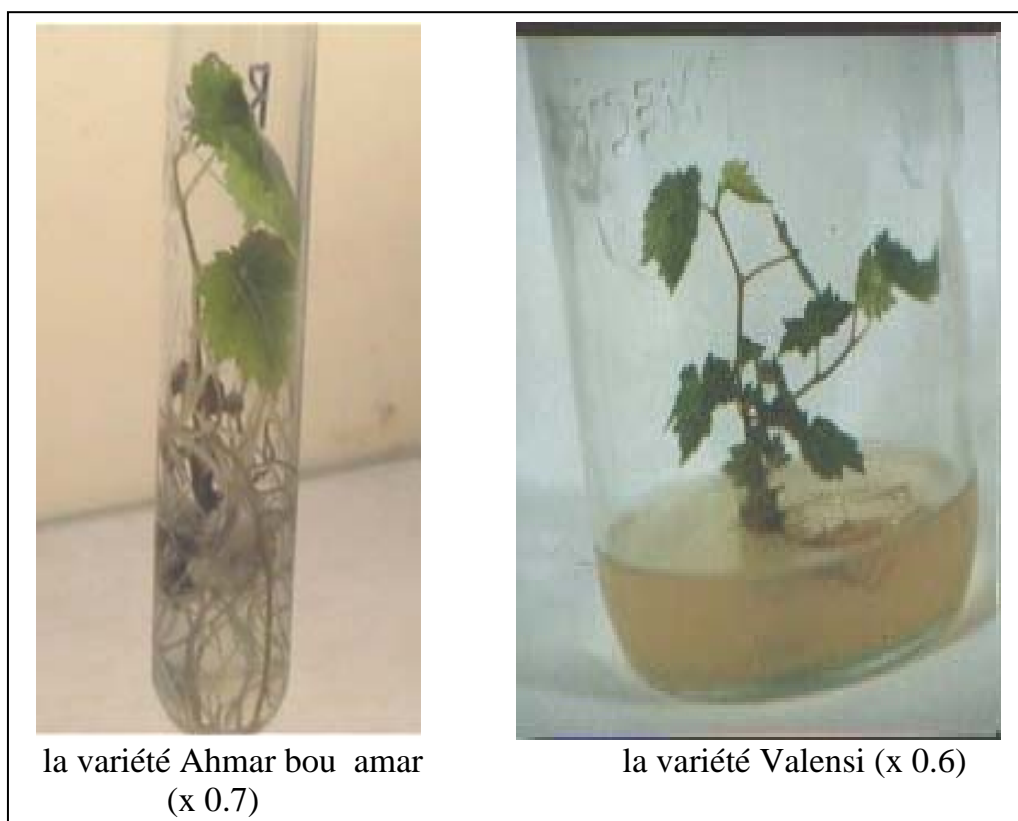
De même, RIVES (1972), FAVRE et GRENAN (1973), GRENAN (1984), BOUBALS (1991) et FOURNIOUX et HELOIR (1999) signalent que les technologies qui utilisent la culture *in vitro* pour la production de plants de vigne conduisent généralement à des modifications de ses caractères morphologiques et font apparaître des traits de juvénilité comparables à ceux d'une plante issue de la germination d'un pépin.

Cette variabilité concerne l'absence de vrille, la disposition des feuilles, leur forme plus dentelées et l'augmentation des pigmentations anthocyaniques des rameaux (MUR, 1979 ; GRENAN, 1983). Selon GRENAN (1994), les caractères de juvénilité au niveau des plantules issues de la culture *in vitro* peuvent disparaître par un suivi agronomique : taille longue, greffage des bourgeons de la partie terminale.

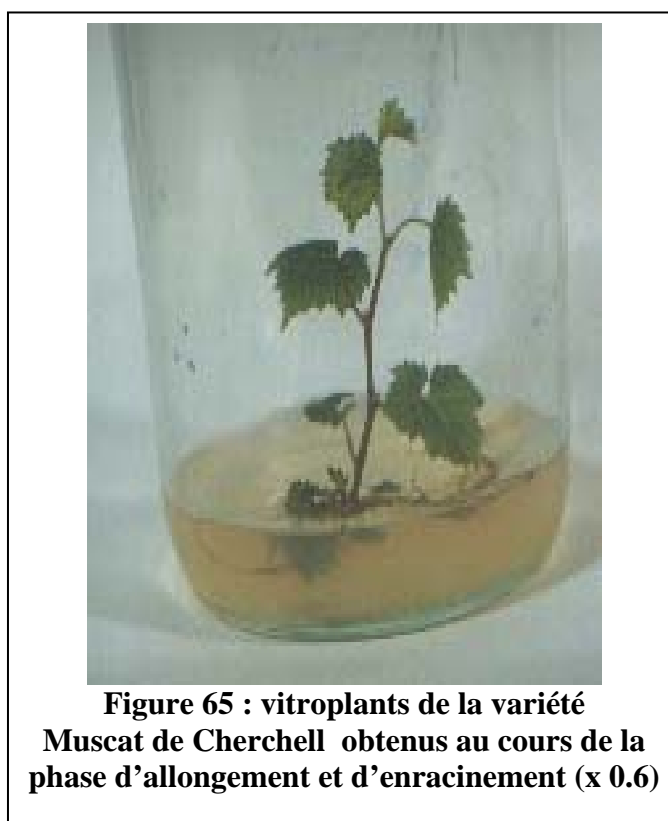
MARTINEZ et al (1994) ont pu affirmer que la persistance des caractères juvéniles des vitroplants de la vigne n'est pas définitive et ils ont montré que la distinction entre les vitroplants et les plantes *in vivo* est difficile après une saison de comportement *in vivo*.

D'après MARGARA (1989) la plante peut présenter une succession de caractéristiques morphologiques et physiologiques au cours de son développement qui affectent le plus souvent la forme des feuilles et le type de croissance des rameaux. Dans l'exemple du Fraisier, les nouvelles feuilles produites sont entières tandis que les feuilles de la plante plus âgées sont trifoliées. Cependant ce caractère juvénile ne persiste pas après arrêt de repiquage fréquent sur un milieu contenant une cytokinine.

Chez le palmier dattier cultivé *in vitro*, le caractère de jeunesse apparaît au niveau des feuilles qui sont simples et entières au lieu d'être palmées (BOUGUEDOURA, 1991).



**Figure 64 : vitropants obtenus au cours de la phase d'allongement et d'enracinement.**



## 2.4/ Phase d'acclimatation

L'acclimatation est une étape très importante pour le succès de la multiplication végétative *in vitro*.

Cette étape consiste à transférer les vitroplants du milieu gélosé vers un substrat naturel (Figure 67) ; les racines sont préalablement lavées à l'eau pour éliminer toute trace de gélose qui faciliterait la prolifération des champignons ou bactéries.

En effet, selon BIGOT et ANSTETT (1992), les plantules cultivées *in vitro* sont peu lignifiées et souvent dépourvues de cuticule dont le rôle est de limiter la transpiration, elles sont de ce fait très sensibles à toute attaque d'origine fongique ou bactérienne, de même elles sont fragiles pour supporter directement l'environnement ambiant.

Afin d'habituer les vitroplants aux nouvelles conditions, nous avons procédé à l'ouverture des bocal ou des mini-serres de façon progressive.

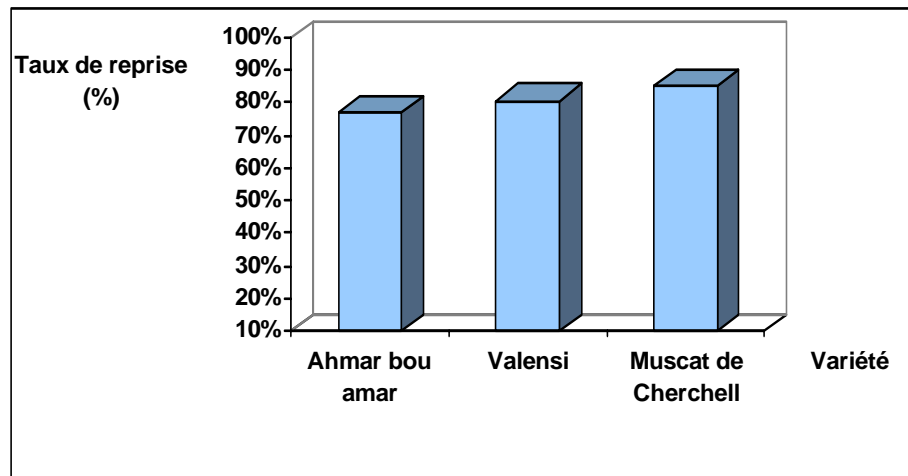
Après le transfert des vitroplants sur le nouveau substrat constitué d'un mélange de tourbe et de perlite, les feuilles sont restées vertes pendant une semaine. Puis les feuilles les plus âgées (de la base) sont tombées, cette même observation a été signalée aussi par JELLALI (1996).

Au bout de la troisième semaine d'acclimatation, de nouveaux bourgeons apparaissent. Ils développent une activité intense permettant la formation de nombreuses feuilles. Les plants présentent alors un aspect vigoureux, avec croissance continue (Figure 68, 69, 70).

Le taux de reprise des vitroplants lors de cette phase est de 77.14% pour la variété Ahmar bou amar, 80.76% pour la variété Valensi et 85.10% pour la variété Muscat de Cherchell (Tableau 24, Figure 66).

**Tableau 24 : taux de reprise des vitroplants en acclimatation**

VARIETE	NOMBRE DES VITROPLANTS ACCLIMATES	NOMBRE DES VITROPLANTS DESSECHES	NOMBRE DES VITROPLANTS REPRIS	TAUX DE REPRISE
AHMAR BOU AMAR	35	8	27	77.14%
VALENSI	52	10	42	80.76%
MUSCAT DE CHERCHELL	47	7	40	85.10%



**Figure 66 : taux de reprise des vitroplants en acclimatation**

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que cette étape d'acclimatation des vitroplants de la vigne n'a pas présenté de difficultés majeures, contrairement aux travaux de JELLALI (1996) qui a obtenu un taux de reprise très faible (12.53%) des vitroplants acclimatés.

Selon CHALUPA (1984), l'acclimatation des plantules enracinées constitue le problème majeur à la réussite de la régénération du Chêne liège (*Quercus suber*), cependant les essais de LAMRATI et EL KBIACH (2002) ont pu maintenir la survie des vitroplants de *Quercus suber* acclimatés. Ces auteurs considèrent que le maintien d'une humidité relative au début de l'acclimatation suivie d'une diminution progressive de son degré permet l'obtention de plantes vigoureuses capables de continuer une croissance normale.

Les essais d'acclimatation menés par LAHCENE (2003) sur les vitroplants de Thuya de Berberie ont donné un taux de mortalité de 100%, selon ce même auteur, cette phase nécessite de tester des substrats et des conditions de préacclimatation pour arriver à une meilleure réussite de cette phase.



**Figure 67 : vitroplants mis en miniserre d'acclimatation (x 0.4)**



**Figure 68 : vitroplants de la variété Ahmar bou amar obtenus après un mois et demi d'acclimatation (x 0.35)**



**Figure 69 : vitroplants de la variété Valensi obtenus après un mois et demi d'acclimatation (x 0.35)**



**Figure 70 : vitroplants de la variété Muscat de Cherehell obtenus après un mois et demi d'acclimatation (x 0.3)**

### 3/ CONTROLE DE L'ETAT SANITAIRE DES VITROPLANTS OBTENUS

Après deux mois et demi d'acclimatation des vitroplants de la vigne, nous avons procédé au contrôle de leur état sanitaire vis-à-vis des virus du court noué, de l'enroulement foliaire et de la marbrure par le test sérologique Elisa. Les résultats obtenus sont enregistrés sur les Tableaux : 25, 26 et 27.

**Tableau 25 : résultats du test Elisa vis à vis du virus du court noué (GFLV) des vitroplants des variétés Ahmar bou amar et valensi**

VARIETE	DENSITE OPTIQUE (nm)	REACTION	VARIETE	DENSITE OPTIQUE (nm)	REACTION
H1	0.204	+	V1	- 0.119	-
H2	0.083	+	V2	0.069	+
H3	0.150	+	V3	- 0.048	+
H4	- 0.032	+	V4	- 0.045	+
H5	- 0.124	-	V5	0.052	+
H6	- 0.094	+	V6	- 0.122	-
H7	- 0.085	+	V7	0.037	+
<b>TP</b>	<b>0.089</b>	+	V8	- 0.100	+
<b>TN</b>	<b>- 0.121</b>	-	V9	- 0.111	+
			V10	0.059	+

H = Ahmar bou amar  
V = Valensi

TP = témoin positif  
TN = témoin négatif

**Tableau 26 : résultats du test Elisa vis à vis du virus de la marbrure (GFKV) des vitroplants des variétés Ahmar bou amar et Valensi**

VARIETE	DENSITE OPTIQUE (nm)	REACTION	VARIETE	DENSITE OPTIQUE (nm)	REACTION
H1	- 0.054	-	V1	- 0.063	-
H2	- 0.065	-	V2	- 0.065	-
H3	- 0.060	-	V3	- 0.060	-
H4	- 0.067	-	V4	- 0.061	-
H5	- 0.053	-	V5	- 0.058	-
H6	- 0.063	-	V6	- 0.062	-
H7	- 0.065	-	V7	- 0.059	-
<b>TP</b>	0.169	+	V8	- 0.058	-
<b>TN</b>	- 0.050	-	V9	- 0.051	-
			V10	- 0.056	-

H = Ahmar bou amar  
V = Valensi

TP = témoin positif  
TN = témoin négatif

**Tableau 27 : résultats du test Elisa vis à vis du virus de l'enroulement foliaire (GLRaV) des vitroplants de la variété Muscat de Cherehell**

VARIETE	DENSITE OPTIQUE (nm)	REACTION
M1	- 0.058	-
M2	- 0.066	-
M3	- 0.063	-
M4	- 0.065	-
M5	- 0.066	-
M6	- 0.062	-
<b>TP</b>	0.114	+
<b>TN</b>	- 0.054	-

M = Muscat de Cherehell ; TP = témoin positif ; TN = témoin négatif

L'examen de ces tableaux montre que la culture *in vitro* des méristèmes à partir de plants virosés nous a permis de guérir à 100% la variété Muscat de Cherehell qui a été atteinte par le virus de l'enroulement foliaire (GLRVaIII).

Le test Elisa a révélé aussi que les deux variétés Ahmar bou amar et Valensi se sont débarrassées du virus de la marbrure (GFKV) à 100%, par contre nous avons constaté que 29 vitroplants de la variété Ahmar bou amar ont réagit positivement vis-à-vis du virus du court noué avec un pourcentage de guérison de 17% et 43 vitroplants de la variété Valensi ont réagit positivement vis-à-vis du virus du court noué avec un taux de guérison de 17%.

Ainsi, le GFLV s'est révélé persistant, le taux d'assainissement étant de 17% pour les deux variétés court nouées Ahmar bou amar et Valensi ; selon GALZY (1961;1963), VALAT (1979) et GREANAN (1980), l'assainissement contre certains virus nécessite un traitement de culture *in vitro* associé à la thérapie.

## **DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS GENERALES**

Les maladies virales constituent le plus grand problème de la vigne dans le monde, car aucune lute chimique ne peut être envisagée.

Ces viroses sont à l'origine de pertes importantes de récoltes, de vigueur et de longévité de la vigne.

Le diagnostic des maladies virales repose sur une série de méthodes conduisant à l'identification du virus.

La détection par symptomatologie constitue la première étape du diagnostic. Dans le cadre de ce travail nous avons effectué des prospections visuelles au vignoble et sous serre sur trois variétés de vigne de table : Ahmar bou amar, Valensi et Muscat de Cherchell dans le but de détecter trois viroses : le court noué, la marbrure et l'enroulement foliaire.

Cette méthode a permis de noter les symptômes du court noué et de la marbrure sur les variétés Ahmar bou amar et Valensi alors que les symptômes de l'enroulement foliaire ne se manifestent pas chez ces deux variétés.

Chez la variété Muscat de Cherchell, nous avons enregistré des légers symptômes d'enroulement foliaire au vignoble de Cherchell.

La symptomatologie ou le diagnostic visuel constitue la première étape de l'évaluation sanitaire au vignoble. Cependant, la latence de certains virus empêche la manifestation des symptômes tel que l'enroulement foliaire qui a été révélé au vignoble de Cherchell sur la variété de Muscat de Cherchell et dont les symptômes n'ont pas été visibles sous serre.

Cela nous a conduit à passer à une deuxième méthode de détection des virus : l'inoculation mécanique sur des indicateurs herbacés.

Dans ce cadre, nous avons inoculé la variété Muscat de Cherchell sur trois espèces d'hôtes herbacés (la courgette, la tomate et le petit pois).

Les symptômes extériorisés sur les trois variétés indicatrices correspondent à ceux provoqués par le virus de l'enroulement foliaire.

Les symptômes sont apparus après trois jours pour la tomate et le petit pois et six jours pour la courgette.

Ce test a permis de montrer que les trois espèces inoculées réagissent différemment à la présence du virus ce qui a permis de les classer selon leur sensibilité et selon l'importance du virus avec des taux considérables respectivement 76% et 65%. Mais d'après la diversité des symptômes, nous avons remarqué que la courgette réagit mieux à la présence du virus avec un taux moyen des symptômes de 43%.

Cet essai d'indexage a permis de mettre en évidence l'intérêt de cette méthode de diagnostic pour la détection des virus de la vigne. En effet, l'utilisation des plantes indicatrices herbacées est très avantageuse vu qu'elles sont très faciles à cultiver ; de plus elles se distinguent par une croissance et une extériorisation des symptômes très rapide (durée maximale de 15 jours).

---

Dans le but de mieux valoriser les résultats obtenus par symptomatologie au champ et par inoculation mécanique sur indicateurs herbacés, il est préférable d'effectuer les tests Elisa contre les virus du court noué, l'enroulement foliaire et la marbrure.

Ce test nous a permis de confirmer les observations visuelles au vignoble et sous serre et il nous a même révélé la présence du virus de l'enroulement foliaire (GLRaV III) chez la variété Muscat de Cherehell bien que les symptômes n'ont pas été extériorisés sous serre.

Ainsi, il ressort des résultats du test Elisa que les variétés Ahmar bou amar et Valensi sont atteintes de deux viroses : le court noué et la marbrure, alors que la variété Muscat de Cherehell a réagi positivement vis-à-vis du virus de l'enroulement foliaire.

D'autre part, chez les espèces indicatrices herbacées (la courgette, la tomate et le petit pois) les densités optiques obtenues par le test Elisa nous ont permis de comparer les résultats à ceux obtenus par l'inoculation mécanique.

Ainsi, l'observation visuelle, l'inoculation mécanique sur indicateurs herbacés et le test Elisa sur la variété Muscat de Cherehell et sur les espèces indicatrices ont révélé que la variété Muscat de Cherehell est atteinte du virus de l'enroulement foliaire GLRaV III. Ceci montre que les résultats du dépistage ne peuvent être sûrs qu'après confirmation par le test sérologique Elisa qui est le plus sensible et détecte la présence des virus à concentration très faible (WALTER et DEMANGEAT., 1994).

D'après tous les résultats obtenus nous pouvons retenir que le test sérologique Elisa précédé par des prospections visuelles et l'indexage biologique par inoculation mécanique sur indicateurs herbacés peut être recommandé dans le cadre de la sélection sanitaire.

A la lumière des résultats de la première partie concernant les méthodes de diagnostic des maladies virales de la vigne, nous avons entamé le deuxième volet de notre travail : l'assainissement par culture in vitro des méristèmes de vigne virosés.

En commençant ce travail, nous sommes passés par plusieurs étapes dans le but d'aboutir à la propagation d'un matériel végétal exempté de virus.

Par rapport à cet objectif nous avons obtenu un certain nombre de résultats qui seront discutés en plusieurs parties :

Concernant, le choix de la technique de désinfection du matériel végétal, nous avons testé l'effet de deux solutions désinfectantes à base d'hypochlorite de sodium et d'hypochlorite de calcium à des concentrations différentes et à des temps de trempage variables et c'est l'hypochlorite de sodium à 3% à une durée de temps de 15 minutes qui nous apporte satisfaction. En effet du fait que les méristèmes sont entourés par les ébauches foliaires ils ne nécessitent pas des méthodes de stérilisation trop lourdes ; c'est ce qui a été signalé par BOCCON-GIBBOD (1989).

Concernant le type de méristème, les résultats obtenus au cours de nos essais montrent que les méristèmes de vigne prélevés sans primordia foliaire ( $T_1$ ) se nécrosent et n'aboutissent pas à terme à cause de leur taille réduite, par contre le prélèvement des méristèmes avec deux primordia foliaires s'est avéré la meilleure méthode de régénération et la production de plants indemnes de viroses.

A l'issue de ces résultats, les méristèmes de type T<sub>2</sub> ont été retenus comme explants ; ces résultats concordent avec ceux de GALZY (1972), BENABDALLH (1996) et JELLALI (1996).

L'influence de la température du jour sur la croissance des méristèmes a été montrée et c'est 24°C qui semble la température la plus appropriée au développement des méristèmes de la vigne. Ceci est confirmé aux résultats de JELLALI (1996),

Pour compléter cette étude, nous avons testé l'influence de la concentration en substances de croissance et l'effet du milieu de base d'initiation sur la croissance des méristèmes.

En effet, il existe une relation directe entre la composition du milieu et le comportement des plants cultivés *in vitro*. C'est ainsi, que nous avons conçu l'utilisation de deux milieux de base MS (62) et CP (87), à des concentrations en substances de croissance différentes.

Dans un premier temps, nous avons tenté de voir l'effet de la BAP seule ou associée à une auxine : l'ANA à différentes concentrations les résultats obtenus montrent que l'absence des régulateurs de croissance ne favorisent pas la croissance des méristèmes. Par contre, l'aptitude des méristèmes à se développer est influencée par la concentration en BAP.

Les trois variétés de vigne : Ahmar bou amar, valensi et Muscat de Cherehell donnent les meilleurs pourcentages de reprise : 85% pour Ahmar bou amar et valensi et 80% pour Muscat de Cherehell, sur le milieu MS<sub>2</sub> contenant 1.5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP et 85% pour Ahmar bou amar et Muscat de Cherehell et 90% pour la variété Valensi, sur le milieu CP<sub>2</sub> contenant 1.5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP..

BARLASS et SKENE (1978) ont fait mention de l'effet bénéfique de l'utilisation de 2 mg.L<sup>-1</sup> de BAP sur la croissance des méristèmes de la vigne.

L'action du milieu de base sur la croissance des méristèmes indique que c'est le milieu CP<sub>2</sub> qui est le plus favorable bien que le MS<sub>2</sub> reste aussi valable. Ainsi, 90% de taux de reprise de croissance ont été observés chez la variété Valensi et 85% pour les deux variétés Ahmar bou amar et Muscat de Cherehell, en une durée de temps qui ne dépasse pas 15 jours de séjour dans le milieu de culture.

Ainsi, pour la première étape de la culture *in vitro* nous retenons :

- la méthode de désinfection du matériel végétal : hypochlorite de sodium à 3% pendant 15 Mn.
- la méthode de prélèvement du méristème: type T<sub>2</sub> (dôme apical avec deux primordia foliaires).
- la température du jour : 24°C.
- le milieu de culture de base : CP<sub>2</sub> avec 1.5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.

Ainsi, les autres milieux ont été abandonnés dans le reste de notre étude.

Après 3 à 4 semaines de séjour dans le milieu d'initiation, les méristèmes se développent en produisant 4 à 5 bourgeons adventifs qui à leurs tour repiqués dans leur

milieu neuf donnent des pousses feuillées au sein desquelles apparaissent de nouveaux 4 à 5 bourgeons.

Ainsi, nous avons obtenu 35 pousses de la variété Ahmar bou amar à partir de 7 méristèmes issus de la phase d'initiation, avec un taux de reprise de 41,17% et un taux de multiplication de 5%.

Chez la variété Valensi, le taux de multiplication était de 5,2% avec un pourcentage de reprise de 55,5%.

Chez Muscat de Cherchell, 47 pousses ont évolué pour atteindre un taux de reprise de 35,29% et un taux de multiplication de 7,8%.

Ces résultats obtenus au cours de la phase de multiplication permettent de montrer que la variété Muscat de Cherchell donne les meilleurs résultats, suivi par les variétés Valensi et Ahmar bou amar.

Au bout de 3 à 4 subcultures, les pousses obtenues sont transférées sur le milieu d'allongement CP<sub>2</sub>. Après un mois de séjour dans ce milieu, les pousses s'allongent bien pour atteindre 7 à 8 cm de longueur avec formation de 5 à 6 feuilles. A ce stade nous avons constaté la formation spontanée des racines qui peuvent atteindre 20 cm de longueur.

Enfin l'acclimatation est une étape déterminante pour la réussite de la technique d'assainissement par culture *in vitro* des méristèmes.

Pour notre part, la phase d'acclimatation réalisée sur les vitroplants des trois variétés a donné un pourcentage de reprise très important 77.14% pour la variété Ahmar bou amar, 80.76% pour la variété Valensi et 85.10% pour Muscat de Cherchell.

Les travaux entrepris ont conduit à la guérison des plants atteints de la marbrure et de l'enroulement foliaire reconnues comme économiquement graves. Les premiers tests sanitaires réalisés sur le matériel ainsi obtenu tendent à montrer que les deux virus ont été éliminés à 100%, tandis que le virus du court noué reste persistant avec un taux de guérison de 17%.

Enfin, il n'en demeure pas moins que les recherches doivent être poursuivies, étant donné la dégradation sanitaire du vignoble algérien. Il est temps d'entreprendre un programme rigoureux de sélection sanitaire en donnant la priorité aux variétés autochtones adaptées à nos conditions climatiques.

La poursuite et l'amélioration de ces travaux, permettront d'entamer un programme de lutte appropriée, pour tenter de minimiser et de remédier aux dommages observés.

---