



المجلة الجزائرية للمناطق الجافة
Journal Algérien des Régions Arides (JARA)
 Algerian Journal of Arid Regions

Research Paper

Actualisation à la révélation de deux virus responsables à la maladie du court noué de la vigne du genre *Vitis* dans la région Centre et Ouest de l'Algérie par voie sérologique et biochimique

Update on the revelation of two viruses responsible for the vine knotted vine disease of the genus *Vitis* in the Central and Western region of Algeria by serological and biochemical means.

M.TAHIRINE^{1*} ; M. LOUANCHI², M. AITOUADA²

1.Centre de recherche scientifique et technique des régions arides, Station des Bioressources, ElOutaya, Biskra

2.Département de Botanique, Ecole nationale supérieure agronomique (ENSA :Ex-INA), ElHarrach-Alger

Received: 29 October 2019 ; Accepted: 21 November 2019, Published: December 2019

Abstract

In this study, 300 samples were collected from three departments in the center and seven departments in the west of the country, on 12 grapevine varieties. The samples were subjected to two serological tests, one using anti-GFLV monoclonal serum and the other using anti-GFLV/ArMV serum. The results obtained showed that 47% of the samples collected responded positively to the first serum, while 45% reacted with the second. In a second step, 16 viral extracts were subjected to an SDS-PAGE to determine the molecular weight of the capsid protein. A protein band with a molecular weight of 55,559 Dalton has been identified. This molecular weight is close to those of the capsid proteins of GFLV(56,000 Dalton) and ArMV (54,000 Dalton)

Key Words: grapevine, GFLV, ArMV, ELISA, SDS-PAGE, Alegria

Résumé

Dans cette étude, Un nombre total de 300 échantillons ont été prélevés de trois wilayas du centre et sept wilayas de l'ouest du pays, sur 12 cépages de la vigne. Les échantillons ont été sujets à deux tests sérologiques, un premier en utilisant un sérum monoclonal anti-GFLV, et le deuxième en utilisant un sérum anti-GFLV/ArMV. Les résultats obtenus ont montré que 47% des échantillons prélevés ont répondu positivement au premier sérum, alors que 45% ont réagi avec le deuxième. Dans un deuxième temps, 16 extraits viraux ont été soumis à une SDS-PAGE pour déterminer le poids moléculaire de la protéine capsid. Une bande protéique dont le poids moléculaire correspond à 55.559 Dalton a été identifiée. Ce poids moléculaire est proche de ceux des protéines capsides du GFLV (56.000 Dalton) et de l'ArMV (54.000 Dalton)

Mots clés : Vigne, GFLV, ArMV, ELISA, SDS-PAGE, , Algérie.

* *Corresponding author :TAHIRINE MOHAMMED*

E-mail address: tarektahirine@gmail.com



1. Introduction

La vigne (*Vitis vinifera* L.) appartient à la famille des ampélidacées (vitacées). Les vitacées sont considérées, en général, comme des lianes, s'attachant à des supports variés grâce à des vrilles oppositifoliées, simples ou le plus souvent ramifiées. Cette famille comprend dix-neuf genres (Burger *et al.*, 2009).

La maladie du court noué est la maladie virale la plus dévastatrice de la vigne partout dans le monde là où la vigne est cultivée. Elle est causée par au moins seize (16) virus dont deux sont les plus importants : le grapevinefanleaf virus (GFLV) et l'arabismosaic virus (ArMV). Ces derniers appartiennent au genre *Nepovirus* de la famille des *Comoviridae*. Ils ont des particules virales isométriques constituées d'un seul type de protéine capsidique de taille variable selon le virus (56 Kda pour le GFLV et 54 pour l'ArMV). Les dégâts occasionnés par la maladie sont variables en fonction de la virulence de l'isolat viral, la sensibilité du cépage et des facteurs environnementaux (Martelli, 2010).

La maladie fut rapportée pour la première fois en Algérie en 1913, des études ultérieures ont porté sur la maladie : anonyme (1951) ; Boussalem (1981) ; Galitelliet *al.* (1991) et Lekikotet *al.* (2012). Notre étude s'inscrit dans le contexte d'identifier deux virus impliqués dans cette maladie sur la vigne en Algérie.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel végétal

2.1.1. Zone de prospection

Les lieux d'échantillonnage sont localisés dans le centre et l'ouest de l'Algérie (tableau 1). La plupart des vignobles algériens se situent dans le littoral ou l'intérieur pour des raisons historiques (la politique coloniale visant à rendre l'Algérie, et surtout l'ouest algérien une zone de production potentielle de raisin de cuve).

Tableau 1 : Les wilayas prospectées

Étage climatique	Wilaya	Nombre d'échantillons
Littoral	Blida	40
	Alger	7
	Oran	31
	Mostaganem	17
	Boumerdes	35
	Ain T'mouchnt	31
Intérieur du pays L'ouest	Tlemcen	34
	Sidi Belabès	41
	Mascara	23
	Relizan	41

2.1.2. Échantillonnage et conservation:

Un nombre total de 300 échantillons (feuilles avec ou sans symptômes) ont été prélevés de trois wilayas du centre et sept de l'ouest du pays, sur 12 cépages de la vigne (Tableau 2). L'échantillonnage a été réalisé dans la période juin-juillet, en passant sur les deux diagonales de la parcelle, en même temps, une prospection des symptômes a été réalisée. Les échantillons sont conservés dans des sacs en papier, avec une étiquette mentionnant l'origine de l'échantillon, le cépage et la date de prélèvement. Au laboratoire, les échantillons sont déshydratés selon la méthode de Bos (De Wijs et Suda-Bachmann, 1979) puis conservés à 4°C.

Tableau 2 : Les cépages prospectés

N°	Cépage	Nombre d'échantillons
1	Aberkane	17
2	Ahmar de Mascara	16
3	Alicante Bouchet (4)	81
4	Alphonse Lavallée	16
5	Aneb El Kadi	8
6	Cardinal	31
7	Chaouche Blanc	7
8	Dattier de Beyrouth	17
9	Muscat de Gustave	8
10	RedGlob	25
11	Sabel	9
12	Valencie	65

2.2. Test sérologique:

L'ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) est une technique sérologique basée sur la réaction anticorps (sérum) – antigène (virus). L'adjonction d'une enzyme aux anticorps permet de révéler la présence du virus par une réaction colorée si celui-ci est présent dans l'échantillon à tester. Cette technique est également utilisée pour les analyses de vérification (Dijkstra et de Jager, 1998).

Deux sera ont été utilisés, un premier monoclonal anti-GFLV fourni par Agritest® (sérum et conjugué), et le deuxième en utilisant un sérum anti-GFLV/ArMV par Bioreba (Kit complet). Pour le sérum anti-GFLV, Les échantillons à tester ont été analysés par la technique immun-enzymatique DAS-ELISA selon les protocoles décrits par Ternynck et Avrameas (Ternynck & Avrameas, 1987). Le choix de la variante directe de l'ELISA est conditionné par la disponibilité des conjugués. Les différents échantillons sont broyés dans le PBS, à raison de 1g d'échantillon dans 4ml du PBS, le broyat est filtré à l'aide d'une étamine. Pour le sérum Anti-GFLV-ArMV, l'extraction a été réalisée en utilisant le kit d'extraction fourni par le sérum.

La lecture des résultats est faite visuellement et par spectrophotométrie à 405nm (lecteur de plaques ELISA (Metertech) après une incubation de 30 minutes puis 1 heure à température ambiante.

La moyenne de lecture pour chaque échantillon est comparée à un seuil de détection (SD) calculé pour chaque plaque:

$$SD = \text{Moy. (D.O) témoin} + 4 \text{ ET (D.O) témoin}$$

Les fréquences d'infection pour chaque wilaya ainsi que pour chaque variété sont calculées à l'aide de la formule suivant :

$$\text{Fréquence d'infection (\%)} = \frac{\text{Nombre d'échantillons positifs}}{\text{Nombre total des échantillons}} \times 100$$

Un nombre total de 300 échantillons (Tableau 1) ont été prélevés de trois wilayas du centre et sept wilayas de l'ouest du pays, sur 12 cépages de la vigne. Les échantillons ont été sujets à deux tests sérologiques (DAS-ELISA), un premier en utilisant un sérum monoclonal anti-GFLV, et le deuxième en utilisant un sérum anti-GFLV/ArMV.

2.3. Electrophorèse SDS-PAGE:

La méthode utilisée est l'électrophorèse discontinue en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (en présence de SDS), elle permet de séparer les protéines en fonction de leur taille moléculaire (Laemmli & Favre, 1973). Le protocole suivi est celui de Laemmli (1970) (O'donnell, Shukla & Gough, 1982). Les poids moléculaires de chacune des bandes protéiques est estimés par projection sur une courbe étalon établie à partir des logarithmes des poids moléculaires des protéines marqueuses et des distances de migrations de ces mêmes protéines. 16 extraits viraux ayant réagis positivement aux tests sérologiques ont été soumis à une SDS-PAGE (tableau 3).

Tableau 3 : La disposition des échantillons sur le gel d'électrophorèses

N° du puits	L'échantillon déposé
1	Mélange de protéines marqueuses
2	Témoinnégatif (Bioreba)
3	SBV18
4	BLRg1
5	OOTAM5
6	RYA2
7	ATATAB39
8	BTDB9
9	MSAV28
10	BIC2
11	RYAM1
12	SbV17
13	MBV12
14	MMV15
15	MBV13
16	RYA5
17	MATV24
18	BLA15

3. Résultats et discussion :

3.1. Etat générale des vignobles:

Les symptômes observés dans les vignobles prospectés peuvent être catégorisés en : symptômes de malformation (Figure 1); symptômes de modification de la coloration (Figure 2). Selon Martelli (2010), les deux types peuvent être exprimés selon la souche du virus, le cépage cultivé et les conditions environnementales. Les souches plus virulentes causent les malformations des tiges chez les variétés sensibles, alors que d'autres souches moins virulentes n'induisent pas de symptôme. L'éclaircissement inter-nervaire (vein-banding) observé sur le cépage Alicante Bouchet est, selon Sokhandan et Hajizadeh (2007), l'un des symptômes typiques de la maladie du court noué. De même, des symptômes tels que le raccourcissement des entre-nœuds, les doubles- bourgeons, et la chlorose sont caractéristiques du court noué de vigne (Liebenberg et col., 2009).



Figure 1 : Des anomalies de croissance observées durant la prospection : (a) symptôme de bougeon double, (b) plage de plant a croissance lente, (c) un plant chétif



Figure 2 : Des modification de couleur observées durant la prospection : (a) symptôme de vein-banding, (b) chlorose, (c) : mosaïque

3.2. Test sérologique:

Les résultats obtenus ont montré que 47% des échantillons prélevés ont répondu positivement au premier sérum, alors que 45% ont réagi avec le deuxième.

Les fréquences d'infection sont différentes d'une wilaya à une autre (Figure 3). On observe que plus de la moitié des échantillons prélevés des wilayas de Blida, Oran et Boumerdes sont infectés par un des deux principaux virus du court noué. Cependant, les fréquences d'infection des wilayas de Mostaganem, Mascara et Relizane sont proches de 50%.

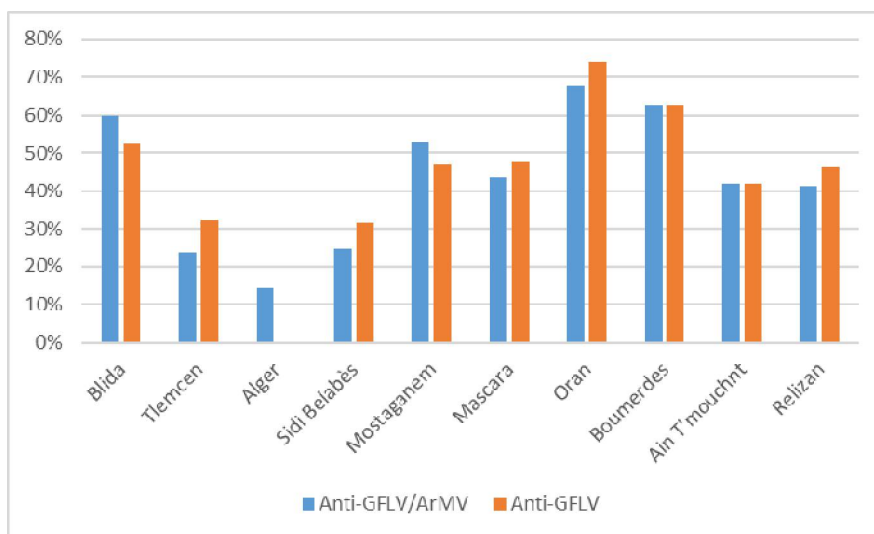


Figure 3 : fréquence d'infection des échantillons prélevés par wilaya prospecté.

La variabilité des fréquences d'infection par cépage est très remarquable (Figure 4), ainsi par exemple des cépages telles que AlplonseLavallée et Aneb El Kadi présentent des fréquences d'infection supérieurs à 70%, alors que le groupe des cépages Sabel ; Dattier de Beyrouth ; Ahmar de Mascara et RedGlob ont des fréquences d'infection compris entre 50 et 75%. Des fréquences d'infection inférieurs à de 25 à 50% ont été obtenu chez les cépages : Aberkane ; Valencie ; Cardinal ; Alicante Bouchet; Muscat de Gustave. Aucun échantillon du cépage Chaouche Blanc n'a réagi positivement vis-à-vis le sérum Anti-GFLV/ArMV, cependant un seul a donné une réaction positive à l'antisérum anti-GFLV. Il faut noter que ces fréquences ne représentent pas un critère de résistance vis-à-vis des virus du court noué.

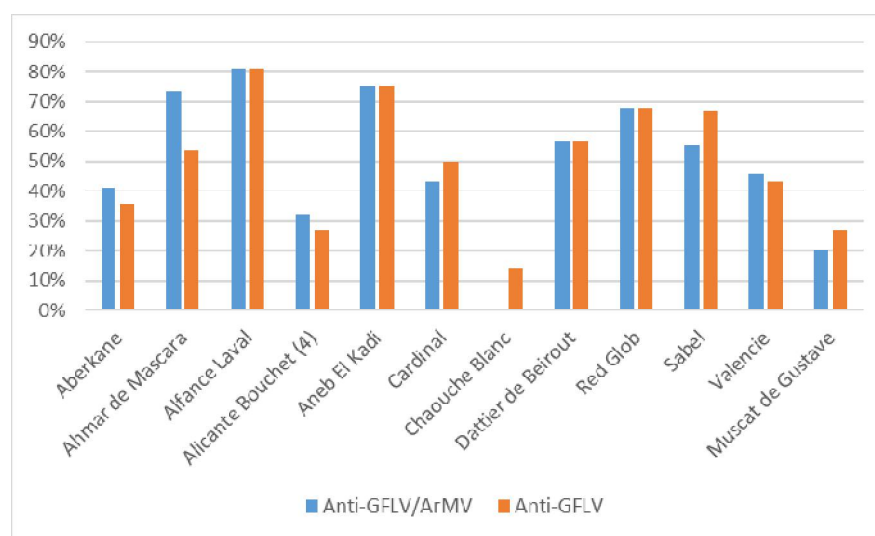


Figure 4 : fréquence d'infection des échantillons prélevés par cépage.

Nous avons pu noter que certains échantillons ne réagissent qu'avec l'antisérum Anti- GFLV/ArMV, ce qui peut signifier qu'ils représentent des cas d'infection simple par l'ArMV, car ils n'ont pas réagi avec l'antisérum anti-GFLV. Martelli et Boudon-Padiou (2006), ont rapporté qu'une infection simple par l'ArMV est possible bien qu'elle reste moins fréquente par rapport l'infection mixte ou l'infection simple par GFLV. Les symptômes causés par l'ArMV sont les même que ceux causé par le GFLV (Anonyme, 2000), ce qui montre la nécessité d'utiliser des anticorps monoclonaux pour confirmer les résultats obtenus.

Ces résultats confirment des travaux antérieurs portant sur la maladie du court noué en Algérie.

La première citation de la présence de la maladie en Algérie date de 1913 (Trabut, 1913), on y décrit l'état d'infestation des vignobles algériens par la maladie du court noué. Un rapport fut publié en 1951 par les services de l'Agriculture en Algérie et dans lequel l'auteur indique la présence de la maladie en se référant au symptôme du raccourcissement des entre-nœuds.

Boussalem (1981), a rapporté que présence de la maladie du court noué dans les pépinières algéroises n'existe que dans des cas isolés.

Dans un rapport d'une inspection réalisée en Algérie, par Gallitelli et Martelli (1989), sur la maladie du court noué, a montré que les plants infectés par le GFLV ne montrent que les symptômes du court noué, un autre virus était présent. Le

virus a été isolé plus tard en Italie et nommé GALV (Grapevine Algerian latent virus).

3.3. Electrophorèse (SDS-PAGE) :

Le gel obtenu de la SDS-PAGE (Figure 5) a montré la présence une bande suspecte d'être d'origine virale, sur 6 extraits : Tessala (Valencie) ; Larbaa (RedGlob) ; Oued T'lilat (Ahmar de Mascara) ; Yellal (Aberkane) ; Sidi Ali (Valencie) et les Issers (Cardinal).

La distance de migration de la bande en question correspond à 55,559 Kda, un poids moléculaire proche de celui de la protéine capsidale du GFLV (56 Kda) et celle de l'ArMV (54 Kda).

La SDS-PAGE a servi comme outil aussi bien de confirmation des tests sérologique que de détermination du poids moléculaire de la protéine capsidale, puisqu'elle constitue plus que 90% de la taille des virions du GFLV et de l'ArMV. (Zarghaniet *al.*, 2014)

Ces résultats viennent confirmer ceux obtenus par des études antérieures, entre autres : Wetzel et ses collaborateurs (2002); Schellenberger et ses collaborateurs (2010) et Terlizzi et ses collaborateurs (2015).

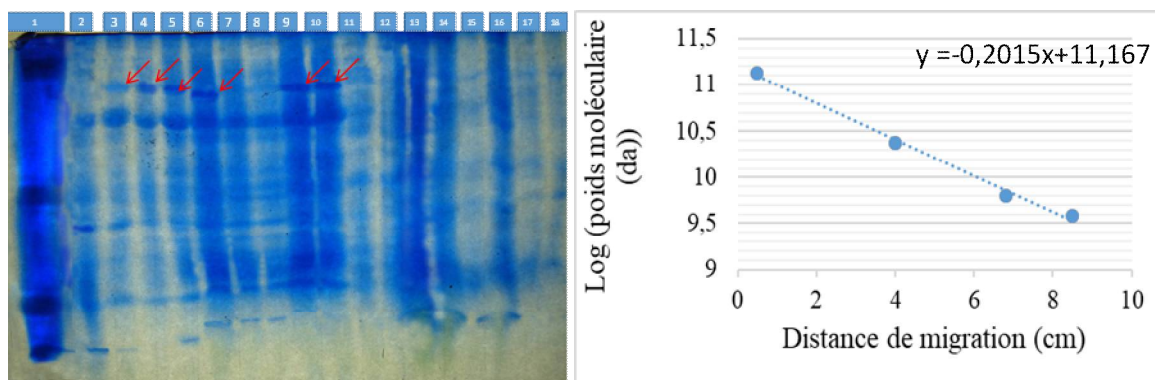


Figure 5 : le gel de la SDS-PAGE. 1 : protéines marqueuses ; 2 : témoins négatif ; 3 à 18 : extrait viraux des échantillons

2. Conclusion

Cette étude vient d'appuyer les études portant sur l'actualisation de la maladie du court noué dans les régions Centre et Ouest de l'Algérie. En utilisant deux anti-séras : un anti-GFLV et un Anti-GFLV/ArMV, les tests sérologiques ont permis d'obtenir des fréquences d'infection des échantillons de plus 45%. Dans un deuxième temps, une protéine avec un poids moléculaire de 55.559 Kda a été identifiée par la technique de SDS-PAGE. En se référant à la bibliographie, ce poids est proche de celui des protéines capsidales du GFLV et de l'ArMV.

3. Remerciements

Cette étude a été réalisée au laboratoire de physiologie végétale à l'École Nationale supérieure agronomique d'El Harrach, Alger (Ex : INA). Un grand merci, au Dr. Lassouane Nassima pour nous avoir permis de travailler dans son laboratoire, et au Dr. Lahad Arezki pour tous ses conseils.

4. Références bibliographiques

- Anonyme, A. (1951). Rapport du conseil de l'expérimentation et des recherches agronomique en Algérie pour 1950-1951. 121p. <https://gd.eppo.int/taxon/GFLV00/distribution/DZ>
- Anonyme, 2000. Data Sheets on Quarantine Pests: Arabis mosaic nepovirus. OEPP and CABI. 5p https://gd.eppo.int/download/doc/28_datasheet_ARMV00.pdf
- Boussalem, M. (1981). Contribution à l'étude du court-Noué dans les pépinières de l'Algérois (Thèse de Magister). Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie, El Harrach-Alger.
- Burger, P., Bouquet, A., & Striem, M. (2009). Grape Breeding. *In* : Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species. New York: Springer-Verlag .
- De Wijs, J., & Suda-Bachmann, F. (1979). The long-term preservation of potato virus Y and watermelon mosaic virus in liquid nitrogen in comparison to other preservation methods. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 85, 23-29. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01976716>
- Dijkstra, J., & Jager, C. (1998). *Practical Plant Virology: Protocols and Exercises*. Berlin: Springer.
- Gallitelli D. and Martelli G.P., 1989. Grapevine Algerian latent virus, a newly recognized Tombusvirus. *Phytoparasitica*, vol. 17. Pp.: 61-62.
- Laemli, U., & Favre, M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4: I. DNA packaging events. *Journal of Molecular Biology*, 80(4), 575-599. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836\(73\)90198-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836(73)90198-8)
- Lekikot, K., Elbeaino, T., Ghezli, C., & Digiaro, M. (2012). Preliminary Survey of Grapevine Viruses in Algeria. *In* : 17th Congress of ICVG, Davis, California, USA. <http://ucanr.edu/sites/ICVG/files/156711.pdf>
- Liebenberg, A., Freeborough, M., Visser, C., Bellstedt, D. U., & Burger, J. (2009). Genetic variability within the coat protein gene of Grapevine fanleaf virus isolates from South Africa and the evaluation of RT-PCR, DAS-ELISA and ImmunoStrips as virus diagnostic assays. *Virus Research*, 142, 28-35. <https://doi.org/doi:10.1016/j.virusres.2009.01.016>.
- Martelli, G. (2010). *Virus Diseases of Grapevine*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Martelli G.P. and Boudon-Padiou E., 2006. Directory of infectious diseases of grapevine and viroses and virus-like diseases of grapevine: bibliographic report 1998-2004. *Options méditerranéennes, série B*, no.55. 280p. <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/b55/00800521.pdf>
- O'donnell, I., Shukla, D., & Gough, K. (1982). Electro-blot radioimmunoassay of virus-infected plant sap—a powerful new technique for detecting plant viruses. *Journal of Virological Methods*, 4(1), 19-26. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-0934\(82\)90050-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-0934(82)90050-7)
- Schellenberger, P., Andret-Link, P., Schmitt-Keichinger, C., Bergdoll, M., Marmonier, A., Vigne, E., Lemaire, O., Fuchs, M., Demangeat, G., & Ritzenthaler, C. (2010). A Stretch of 11 Amino Acids in the β B- β C Loop of the Coat Protein of Grapevine Fanleaf Virus Is Essential for Transmission by the Nematode *Xiphinema* index. *Journal of Virology*, 84(6), 7924-7933. <https://doi.org/10.1128/JVI.00757-10>
- Sokhandan, B., & Hajizadeh, M. (2007). Survey for Grapevine fanleaf virus in vineyards of north-west Iran and genetic diversity of isolates. *Australasian Plant Pathology*, 36, 46-52. <https://doi.org/https://doi.org/10.1071/AP06080>

- Terlizzi , F., Pisi, A., Beber, R., Zamorano , A., Credi , R., & Ratti , C. (2015). Genetic variability of the movement and coat protein genes of Grapevine fanleaf virus isolates from Italy . *J Gen Plant Pathol*, 81(1), 1-5. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10327-014-0554-y>
- Ternynck, T., & Avrameas, S. (1987). Techniques immunoenzymatiques. Paris: Inserm.
- TRABUT, L. C. (1913). Court-noue et deperissement des vignes meridionales.12p. Agha - Alger: Imprimerie Agricole et commerciale F.Montégut & A. Deguili .
- Wetzel , T., Jardak , R., Meunier , L., Ghorbel , A., & Reustle , G. (2002). Simultaneous RT/PCR detection and differentiation of arabis mosaic and grapevine fan leafnepoviruses in grapevines with a single pair of primers. *Journal of Virological Methods*, 101, 63-69. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00422-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00422-0)
- Zarghani , S., Dupuis-Maguiraga , L., Bassler , A., & Wetzel, T. (2014). Mapping of the exchangeable and dispensable domains of the RNA 2-encoded 2AHP protein of arabis mosaic nepovirus. *Virology*, 106-113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.04.025>