

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2009

N°36

THÈSE
pour le
DIPLOME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

François HALGAND

Né le 11 Février 1980

Présentée et soutenue publiquement le 30 juin 2009

<p>LE COURT NOUÉ DE LA VIGNE : ÉTAT ACTUEL DES CONNAISSANCES</p>

Président :

Mr Yves François POUCHUS, Professeur de botanique

Membres du jury :

Mme Claire SALLENAVE-NAMONT, Professeur de botanique

Mr Julien PILARD, Pharmacien

SOMMAIRE

I – GENERALITES

A - Généralités sur la vigne

1 - Les différentes espèces de vitis

2 - Reproduction de la vigne

a - Le bouturage et le greffage

b - Reproduction sexuée

i - La pollinisation

ii – La germination du pollen

c - Compatibilité sexuelle avec d'autres espèces végétales sauvages ou cultivées

d - Dissémination de la vigne

B - Généralités sur les phytovirus

1 - Formes et structure des virus des plantes – classification des virus de la vigne

a - Forme et structure

b - Classification des virus de la vigne

2 - Transmission

a- La dissémination par des organes ou tissus nécessaires à la reproduction végétative.

i - Le bouturage

ii - Le greffage

iii - Les bulbes ou les caïeux

b - La dissémination par des organes ou tissus nécessaires à la reproduction sexuée

c - La dissémination par des vecteurs animaux qui se nourrissent sur les plantes

d - La dissémination par contact direct

C - Les différentes viroses de la vigne.

1 - Les viroses majeures de la vigne

a - Court-noué, dégénérescence et dépérissement

i - Les virus en cause

ii - Symptômes

b - L'enroulement viral ou complexe de l'enroulement

i - Les virus en cause

ii - Transmission

iii - Symptômes

c - Le complexe du bois strié (rugose wood complexe)

i - Les virus en cause

ii - Transmission

iii - Symptômes

d - La marbrure ou complexe de la marbrure (fleck complexe)

i - Les virus en cause

ii - Transmission

iii - Symptômes

e - L'incompatibilité au greffage

i - Les virus en cause

ii - Transmission

iii - Symptômes

2 - Les maladies virales mineures infectant la vigne

a - Les maladies européennes

b - Les maladies japonnaises

3 - Les infections « virus-like »

a - La mosaïque des nervures (vein mosaic)

b - La nécrose des nervures (vein necrosis)

c - La maladie des étiations (etiation disease)

d - summer mottle

4 – Maladies viroïdales

II- LE COURT-NOUE : LA MALADIE, **CONNAISSANCES ACTUELLES EN BIOLOGIE**

A – Symptômes, dommages et dégâts

1 - Symptômes

a - Symptômes macroscopiques

i - Sur les sarments

ii - Sur les feuilles

iii - Sur les grappes

iv - Sur les racines

b - Répartition des symptômes en deux grands syndrômes

i - Le syndrome de déformation infectieuse

ii - Le syndrome de la mosaïque jaune

c - Symptômes intracellulaires ou microscopiques

2 - Confusions possibles

a - Carences

i - Carences en bore

ii - Carences en zinc

iii - Carences en fer

iv - Carences en manganèse

v – Carences magnésiennes

b - Atteintes par des ravageurs

i - Acariens comme *Calepitrimerus vitis*

ii - Des thrips

iii - Des cicadelles du genre *Empoasca*

c - Atteinte par des phytoplasmes

d - Une maladie cryptogamique : l'eutypiose

e - Autres causes à l'origine de confusions

3 - Dommages et dégats

B - Les virus en causes

1 – Taxonomie et présentation

a – Le genre *Nepovirus*

b – Historique des découvertes sur le GFLV et l'ArMV

2 – Structure et expression du génôme viral

3 - Multiplication du virus

4 - Mouvement du virus de cellule à cellule

5 - Sérologie et structures des populations / Variabilité génétique d'isolats naturels.

a - Sérologie

b - Diversité génétique

C - Les vecteurs des virus du court-noué

1 - Description des nématodes

2 - Cycle de vie et alimentation

3 - Transmission

4 - Site de rétention des particules virales

D - *Nepovirus*-nématodes : une interaction spécifique déterminée par la protéine de capsid du virus

1 - Spécificité d'association

2 - Les déterminants viraux impliqués dans la spécificité de la transmission des *Nepovirus*. Exemple du GFLV

III – EPIDEMIOLOGIE, DEPISTAGE ET METHODE DE LUTTE

A - Epidémiologie

1 - Transmission par les nématodes à stylet

- a - Répartition géographique de *X. index* et *X. diversicaudatum* / exemple du territoire français.
- b - gamme d'hôtes des nématodes vecteurs et des virus du complexe
- c - Etude de la distribution des nématodes au vignoble / mobilité des nématodes
 - i - Distribution verticale
 - ii - Distribution horizontale
- d - Etude des temps de rétention des virus : *Nepovirus*-nématode = une interaction solide.

B - Méthodes de dépistage

1 - Identification des vecteurs

2 - Caractérisation de la présence de virus dans les nématodes

3 - Le dépistage de la maladie

- a – indexage biologique
- b – inoculation mécanique à des hôtes herbacés
- c - Méthodes immunologiques
 - i – immunoprécipitation
 - ii – ISEM (Immuno Sorbant Electron Microscopy) ou IEM (Immuno Electro Microscopy)
 - iii – ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
- d – Détection à l'aide d'outils moléculaires
 - i – Identification d'ARN double brin (ARNdb)
 - ii – Hybridation d'acides nucléiques
 - iii – PCR (Polymerase Chain Reaction)
- e – Conclusion sur les méthodes de dépistage de la maladie

C – Méthodes de lutte

1 – La sélection sanitaire

- a – La sélection clonale
- b – La sélection sanitaire
- c – La sélection génétique

d – Production et diffusion du matériel sélectionné

2– La lutte contre les vecteurs

a - Itinéraire technique utilisé lors d'un renouvellement parcellaire / recommandations pour la replantation

i – Repos du sol : combien de temps ?

ii – Dévitalisation et arrachage

iii – Désinfection chimique des sols

b – Gestion de la jachère : sol nu ou culture intercalaire

i – sol nu

ii – mise en place des cultures intercalaires

c – Les alternatives possibles aux techniques classiques de renouvellement parcellaire

i – Les plantes nématocides : une alternative possible à la désinfection chimique des sols

ii – La biofumigation

iii – Utilisation de champignons nématocides

iv – autres alternatives

3 - Assainissement par culture *in vitro* et/ou thermothérapie

a – La thermothérapie

b – La culture d'apex ou de méristèmes

4 - L'hybridation et/ou la transgénèse dans le but d'obtenir des porte-greffes résistants

a – Résistance naturelle et transgénique au GFLV et autres virus

b – Résistance naturelle aux nématodes vecteurs de virus

c – Combinaison résistance vecteur/ résistance virus et combinaison des techniques d'hybridation et de transgénèse

d – Y a-t-il des risques à l'utilisation des plantes transgéniques résistantes au virus ?

LISTE DES ABREVIATIONS

AGV : Acide gras volatiles

AILV: Artichoke italian latent virus

ArMV : Arabis mosaic virus

BLMoV : Blueberry leaf mottle virus

CB : Corky barck

CLRV : Cherry leafroll virus

CLSM : Confocal Laser Scanning Microscopy

CP : Coat protein

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ENTAV : Etablissement National pour Amélioration de la Viticulture

GAMaV : Grape vine asteroid associated virus

GFLV : Grapevine Fanleaf Virus

GFP : Green fluorescent protein

GLRaV : Grapevine leafroll associated virus

GRGV : Grapevine red glob virus

GTRSV : Grapevine Tunisian ringspot virus

GYSVd : Grapevine yellow speckle viroïd

HWT : Hot water treatment

ICVG : International council for the study of virus and virus-like diseases of the grapevine

IFV : Institut français de la vigne et du vin

INRA : Institut national de recherche agronomique

ITV : Institut Technique de la Vigne et du vin

KSG : Kobber stem grooving

MP : Protéine de Mouvement

NAPPO : North American Plant Protection Organization

OEPP : Organisation Européenne et méditerranéenne de protection des plantes

ONIVINS : Office national interprofessionnel des vins

PD : Plasmodesmes

PRMV : Peach rosette mosaic virus

RE : Reticulum endoplasmique

RpRSV : Raspberry Ringspot Virus

RSP : Rupestris stem pitting

SLRSV : Strawberry latent ringspot virus

SRPV : Service régional de protection des végétaux

TBRV : Tomato Black Ring Virus

ToRSV : Tomato ringspot virus

TRSV : Tobacco ringspot virus

VMT : Virus de la Mosaic du Tabac

INTRODUCTION

La viticulture est une branche de l'agriculture dont l'importance économique est loin d'être négligeable pour beaucoup de pays. En France, la filière viticole est présente sur la quasi totalité du territoire avec de très nombreuses appellations. Notre pays, réputé pour ses vins de qualité et où la culture de la vigne est une tradition ancrée depuis de très nombreuses années, ne représente pourtant qu'une petite proportion de la production mondiale. Pour les grands pays producteurs de vins ou de raisins de table comme le Chili, l'Afrique du Sud, l'état de Californie ou encore le continent Australien, la santé de cette filière est primordiale. Le court-noué, maladie omniprésente dans tous les vignobles du monde, est une atteinte provoquant de nombreux dégâts sur la vigne, notamment en terme de productivité. Cette virose a donc un impact très important pour l'économie viticole, ce qui stimule l'activité de recherche autour de cette pathologie.

Dans ce contexte d'une science très active et nettement dynamisée par l'essor des technologies moléculaires, il paraît intéressant de se pencher plus en détail sur le problème majeur que représente le court-noué. Nous allons donc présenter la vigne en tant que plante cultivée, des généralités sur les phytovirus, et les grandes viroses affectant la vigne, pour introduire le sujet. Nous détaillerons ensuite la biologie de la maladie du court-noué en l'état actuel des connaissances, ainsi que l'épidémiologie de ce syndrome en s'appuyant plus particulièrement sur les données collectées sur le territoire français. Enfin, les méthodes de lutte aujourd'hui mises en œuvre et les perspectives pour l'avenir, viendront compléter ce document.

I – GENERALITES

A - Generalités sur la vigne

1 - Les différentes espèces de *Vitis*

Le matériel végétal sur lequel porte ce mémoire est la vigne (*Vitis sp.*) dont les plants sont constitués du greffon correspondant à l'appareil aérien, implanté sur le porte-greffe qui fournit l'appareil sous-terrain.

La famille des vitacées appartient à l'ordre des Rhamnales lui-même divisé en neuf genres dont le genre *Vitis*. Ce dernier est séparé en deux sous-genres qui sont *Muscadinia* et *Euvitis*. La quasi totalité des vignes cultivées fait partie des *Euvitis* qui se divisent en trois groupes : eurasiatique, asiatique et américain.

Le groupe de vigne eurasiatique ne comprend qu'une seule espèce : *Vitis vinifera* Linné et son archétype *Vitis vinifera sylvestris*. Avant l'intervention du mildiou et du phylloxera, cette vigne sauvage a pu se développer sans problème dans un grand nombre de sites forestiers européens et au niveau du bassin méditerranéen, et ce aussi bien sous sa forme dioïque que sous des formes hermaphrodites acquises à la suite de croisements spontanés, notamment avec des cépages cultivés plus ou moins proches. En Europe occidentale, cette vigne sauvage a pratiquement disparu sous l'effet de maladies (mildiou, phylloxera), suite à des réaménagements du territoire et à la disparition des forêts primaires. Elle subsiste malgré tout mais de façon anecdotique dans l'est de l'Europe, l'Asie moyenne et dans certaines régions du bassin méditerranéen. La vigne cultivée proprement dite, *Vitis vinifera sativa*, comprend des milliers de variétés ou cépages.

Le groupe des vignes asiatiques comprend un peu plus de 10 espèces souvent peu étudiées dont la plus commune est *Vitis amurensis*. Cette espèce est assez sensible au phylloxera mais très résistante au mildiou et au froid hivernal. En raison de ces propriétés, elle est souvent utilisée comme géniteur dans des programmes d'amélioration génétique.

Le groupe des vignes américaines comprend une vingtaine d'espèces aux caractères organoleptiques inintéressants car les baies ont un goût « foxé ». Leur intérêt réside dans le fait qu'elles présentent une résistance importante à d'importants pathogènes (phylloxera, mildiou, oïdium). De ce fait, les hybrides issus de croisements avec ces espèces constituent désormais les porte-greffes utilisés par la filière viticole. Ils sont également utilisés comme

générateurs d'hybrides producteurs directs après croisement avec *Vitis vinifera*. Les espèces les plus importantes au niveau de leur utilisation viticole sont les suivantes :

- *Vitis labrusca* : sensible au calcaire, sensible au black-rot, assez sensible au phylloxera, moyennement résistante au mildiou et très résistante à l'oïdium
- *Vitis riparia* : sensible au calcaire, très résistante au mildiou, à l'oïdium et au black-rot, facilement bouturable
- *Vitis berlandieri* : résistante au calcaire et à la sécheresse, résistante au phylloxera et au mildiou

La répartition des espèces de vigne est inégale sur les différents continents. Cette situation peut s'expliquer par leur histoire. En effet, des graines fossiles de vigne, datées du début du tertiaire, ont été trouvées au Groenland, en Angleterre, en Europe centrale, en France, au Japon et aux Etats-Unis. Au cours des glaciations du quaternaire, de vastes migrations de faunes et de flores ont eu lieu vers le sud. En Amérique du nord, l'orientation nord-sud des chaînes de montagne a facilité ces migrations. En Europe, par contre, l'orientation majoritairement est-ouest des massifs montagneux a formé une sorte de barrière et freiné la migration, provoquant un appauvrissement de la flore, particulièrement des formes adaptées aux climats chauds comme c'est le cas de la plupart des vitacées américaines. Au cours du réchauffement, une recolonisation partielle à partir des zones de repli s'est effectuée.

On peut enfin imputer la disparition de *Vitis vinifera* en Amérique aux parasites américains (phylloxera, mildiou, oïdium) qui ont été introduits sur le continent européen à la fin du XIXe siècle.

2 - Reproduction de la vigne

a - Le bouturage et le greffage

La vigne cultivée est multipliée de façon végétative depuis 2500 ans. Chez *V. vinifera*, le bouturage est aisé, néanmoins, cette technique a posé des problèmes en Europe à partir de l'invasion phylloxérique, c'est-à-dire avec l'obligation de réaliser les greffages sur des porte-greffes résistants au phylloxera.

La production de jeunes plants nécessite donc une double opération : le greffage qui dépend de la callogénèse et le bouturage dépendant de la rhizogénèse. Avant que le greffage

ne devienne une obligation, une technique usuelle de propagation de la vigne était le marcottage ou provignage, c'est à dire le bouturage de rameaux qui sont détachés de la plante mère après avoir produit des racines.

Le phylloxera (*Dactylsphaera vitifolii* Schimer) est un puceron dont certaines formes radicales s'attaquent aux racines de *V. vinifera*. Les racines des vignes américaines (*V. rupestris*, *V. riparia* *V. berlandieri*, etc) sont indemnes de dégâts. Ce puceron introduit accidentellement en Europe en 1854, a provoqué des dommages identifiés dès 1863 et conduit à la destruction de la quasi totalité du vignoble européen. Le développement de ce parasite se poursuit d'ailleurs toujours notamment dans le vignoble californien. Ce puceron a en effet la capacité de se développer sous tous les climats et dès que le sol contient au moins 3% d'argile.

La première stratégie de lutte a été l'hybridation avec des plants américains, mais celle-ci a vite été abandonnée devant la médiocrité du vin produit. Le greffage de la vigne est donc devenu indispensable. Avec le recul que l'on a désormais, il est possible d'affirmer que le greffage ne modifie en rien le goût des raisins du greffon.

b - Reproduction sexuée

La reproduction sexuée est utilisée dans des programmes de sélection par hybridation mais ne peut avoir lieu dans la nature sans l'intervention de l'homme.

Les fleurs de vignes sont regroupées en inflorescence selon la variété et le milieu. La majorité des variétés à fruit possède des fleurs hermaphrodites. Il existe cependant quelques cépages femelles nécessitant la présence de variétés pollinisatrices dans leurs plantations. Les espèces américaines et quelques espèces asiatiques sont dioïques. On rencontre également certains cas assez rares présentant des fleurs à caractère intermédiaire entre hermaphrodites d'une part, mâles ou femelles d'autre part.

i - La pollinisation

Dans le cas des variétés hermaphrodites, la voie de pollinisation privilégiée est l'autofécondation des ovules d'une fleur par le pollen de la même fleur. La pollinisation autogame découle de la façon dont le pollen est libéré. L'ouverture brusque des sacs polliniques provoque l'éjection du pollen sous forme de petits nuages et le stigmate de la fleur

reçoit les grains de pollen provenant de ses propres anthères. Le stigmate est fonctionnel avant l'ouverture des anthères. Sa surface réceptrice est garnie de pailles imprégnées d'un suc qui, en conditions normales, imbibe dans un délai maximum de 12 heures les grains de pollen, leur permettant d'amorcer leur germination.

Le pollen étant aussi transporté par le vent, on ne peut exclure l'allogamie. Elle est d'ailleurs obligatoire pour les cépages femelles et notamment les raisins de table de ce type. A température ambiante, la durée de vie d'un grain de pollen est de 4 à 8 semaines.

Les agents de dissémination du pollen sont principalement le vent et les insectes. Cependant on ne comptabilise que 2% de pollen de vigne au mois de juin et ce pollen ne représente qu'une part infime de la masse annuelle des pollens déposés sur les sédiments. On en conclue que le rôle du vent est faible et ne semble s'exercer que sur une courte distance. De même, le rôle des insectes dans la pollinisation semble négligeable.

ii - la germination du pollen

La germination du pollen dépend de la température, l'idéal se situant autour de 25 à 28°C, et de la présence de bore. La fertilisation de l'ovule se fait 2 à 3 jours après la pollinisation.

c – Compatibilité sexuelle avec d'autres espèces végétales sauvages ou cultivées.

L'hybridation interspécifique entre espèces du sous-genre *Euvitis* est à la base de nombreuses variétés cultivées, notamment de porte-greffes. L'hybridation entre espèces des sous-genre *Euvitis* et *Muscadinia* est également possible, quoique plus difficile compte tenu de la différence du nombre de chromosomes.

Aucune compatibilité avec des espèces sauvages ou cultivées autre que la vigne n'est connue.

d – dissémination de la vigne.

La dissémination de la vigne peut se faire sous trois formes : bouture, graine et pollen. Des boutures peuvent être disséminées essentiellement par l'homme lors de la taille ou de l'arrachage d'une vigne.

Les graines peuvent être disséminées par les consommateurs de raisins (homme, oiseaux, petits rongeurs, etc).

La dissémination du pollen se fait dans les conditions décrites précédemment.

B – Généralités sur les phytovirus

1 - Formes et structure des virus des plantes – classification des virus de la vigne

a - Forme et structure

Le mot virus est employé depuis l'antiquité mais son sens a beaucoup évolué allant du très vague au précis.

En latin, « virus » signifie « poison ». En latin ancien, il s'agit du suc des plantes et même du sperme, qui n'ont pas vocation à empoisonner. Ce sont certainement les principes nocifs tirés des végétaux qui ont donné au vocable latin la valeur qu'il a gardée.

Passé en plusieurs langues modernes, virus a été employé par les médecins pour désigner les substances organiques capables de transmettre une maladie. Puis, évoluant encore, ce terme va regrouper à la fin du XVII^e siècle les maux vénériens, maux considérés à l'époque comme les plus impurs.

Il faut attendre les travaux de deux grands scientifiques, Davaine (ces travaux portèrent sur la maladie dite « du charbon ») et Pasteur, pour qu'enfin le terme de virus se précise et que certains de ces germes soient identifiés à côté des microbes. Cette distinction s'est faite pour la première fois en 1918 mais elle ne se basait que sur la différence de taille de ces germes, beaucoup plus petits que les microbes et les bactéries (REY A., 2005). Louis Pasteur attribuait alors certaines maladies à des « virus filtrants », c'est-à-dire filtrables à travers les filtres les plus fins. On sait aujourd'hui que les particules virales ont des dimensions de l'ordre du nanomètre (1 nanomètre = 1nm = 10⁻⁹ mètre).

Mais tout ceci concerne la médecine humaine et en réalité la découverte du premier virus est antérieure aux travaux de Pasteur et Davaine. Certains horticulteurs, Hollandais notamment, étaient capables dès le XVIII^e siècle de transmettre les symptômes de mosaïques de la tulipe et du jasmin. Ils greffaient sur des variétés saines des greffons contaminés. Ils inoculaient de cette façon et sans le savoir un agent infectieux qui ne fut identifié que bien plus tard comme étant un virus. Ce sont Ivanovski et Beijerinck qui ont contribué à découvrir le premier virus, le virus de la mosaïque du tabac (DU HAMEL M., 2001). En 1892, Ivanovski passe sur un filtre de Chamberland un extrait de feuille de tabac malade et démontre que cet extrait reste infectieux après filtration. Mais il semble qu'Ivanovski n'a pas pris toute la mesure de sa découverte. Ce n'est qu'en 1898 que Beijerinck appellera pour la première fois « virus », l'agent causal de la mosaïque du tabac. Il appelle cet agent infectieux soluble (expérience de diffusion dans un gel d'agar) *contagium vivum fluidum* pour le différencier d'une bactérie qui est un *contagium fixum*. Il prouve que ce *contagium vivum fluidum* est capable de se reproduire, en effectuant des inoculations en série à des plants de tabac. Il conclut que la mosaïque du tabac est due à une substance particulière soluble, capable de se multiplier dans les cellules vivantes. Les travaux sur le virus de la mosaïque du tabac (VMT) se poursuivent ardemment et c'est en 1936 que Bawden montre qu'en réalité le VMT est une nucléoprotéine.

Il faut différencier les termes de virus et de virion (Pr. COLIMON, 2001).

Virus : agent infectieux à tout moment du cycle de maturation.

Virion : « c'est une particule virale mature et infectieuse libre dans le milieu extérieur, phase ultime de la biosynthèse des virus » (HERBEIN G. 2003).

Selon Andre Lwoff, grand scientifique du début du XX^e siècle qui fut l'un des fondateurs de la biologie moléculaire, on peut définir la particule virale ou virion selon cinq critères (HERBEIN G., 2003) :

1/ le virion ne possède qu'un seul type d'acide nucléique : soit de l'ARN, soit de l'ADN

2/ le virion se reproduit uniquement à partir de son matériel génétique, alors que les autres êtres se reproduisent à partir de la somme de leurs constituants

3/ le virion est incapable de croître et de subir des divisions binaires (scissiparité pour les bactéries ou mitose pour les cellules eucaryotes)

4/ le virion ne possède pas d'information génétique codant pour les enzymes du métabolisme intermédiaire. Il n'y a pas de système enzymatique de production d'énergie.

5/ le parasitisme intracellulaire est strict. La multiplication des virions implique l'utilisation des structures de la cellule-hôte (ribosome, ARNt, activité enzymatique, système de régulation).

Les phytovirus sont donc des entités infectieuses porteuses d'information génétique. Pour se multiplier ils doivent infecter des cellules végétales dont ils détournent le métabolisme en utilisant la machinerie cellulaire pour leur propre multiplication. Les molécules porteuses de l'information génétique d'un virus constituent le génome viral. Ce sont des acides nucléiques (ARN ou ADN) associés à des protéines de structure. On appelle ces protéines les capsomères ou protéines capsidiales. Elles s'assemblent en sous-unités protéiques pour former une coque externe appelée capsid. La capsid stabilise la nucléoprotéine virale. Elle protège l'acide nucléique interne et est capable d'assurer sa protection et sa survie dans le milieu extérieur. Les interactions entre acide nucléique et protéine de la capsid sont très étroites. Des structures protéiques se trouvent bien souvent incluses dans cet ensemble, ce sont les protéines internes. La structure nucléoprotéique définie par l'acide nucléique et les protéines internes prend le nom de nucléoïde. L'ensemble formé par la capsid et le nucléoïde est appelé nucléocapsid.

Si la nucléocapsid constitue à elle seule le virion, on dira qu'elle est nue. Dans de rares cas chez les phytovirus, la nucléocapsid est entourée par une enveloppe composée de lipoprotéines : on dira qu'elle est enveloppée. Chez certains phytovirus, la capsid peut également contenir les molécules d'une enzyme capable de transcrire l'acide ribo-nucléique viral : l'ARN polymérase virale.

Tous les virus ont des formes symétriques. Il existe deux formes de symétrie chez les virus :

- la symétrie hélicoïdale
- la symétrie isométrique icosaédrique.

La symétrie hélicoïdale correspond à des particules virales présentant des formes de bâtonnets rigides ou des formes filamenteuses plus ou moins flexueuses (avec des longueurs généralement comprises entre 50 et 2.000 nm selon les types de virus). La symétrie isométrique icosaédrique encore appelée symétrie cubique donne des particules présentant des formes parasphériques ou globuleuses.

Il existe également des virus possédant des particules bacilliformes et des particules géminées (cf. figure 1).

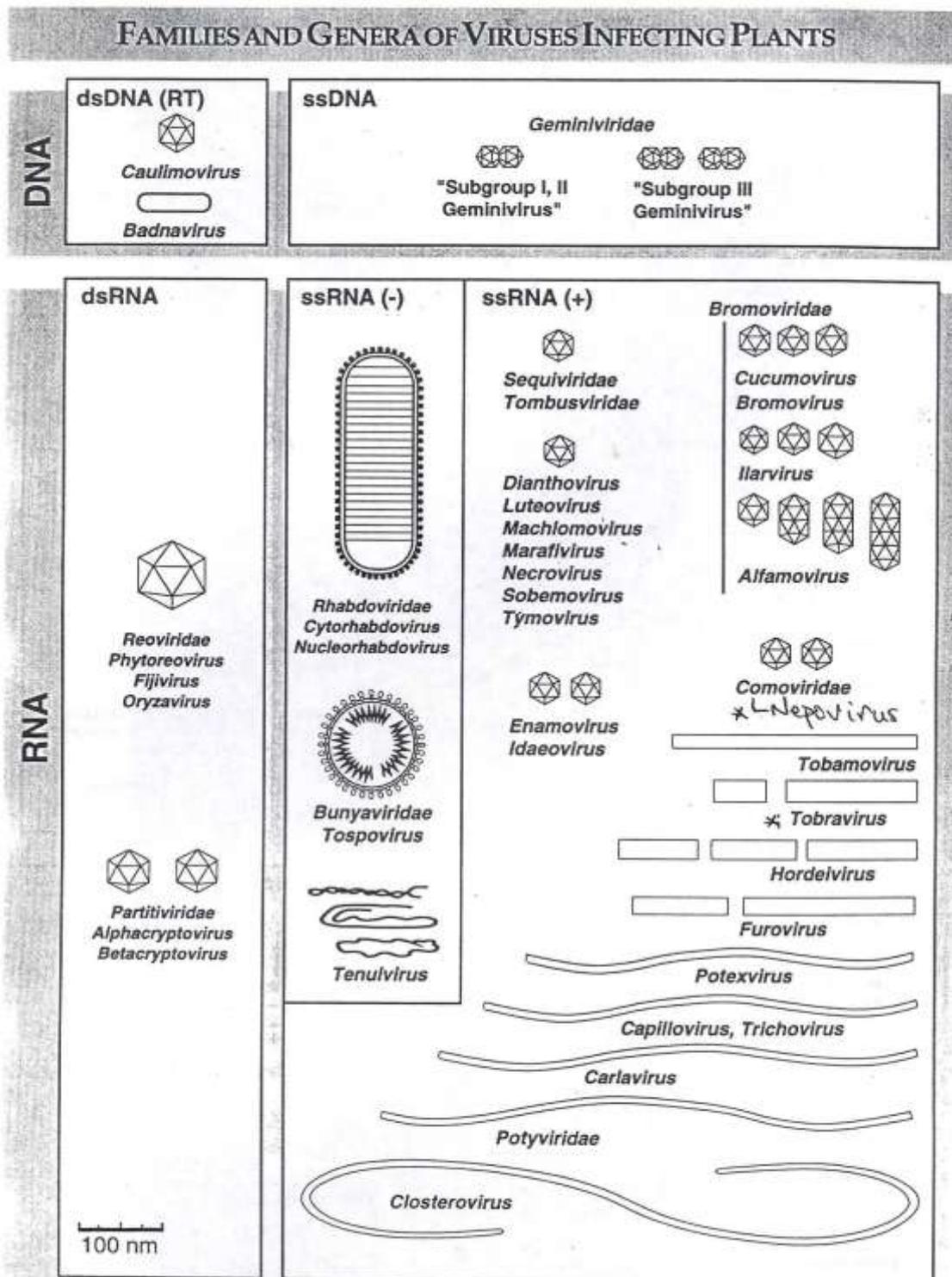


Figure 1 : Forme et structure des virus des plantes. (Source : vectors and plant viruses, 2008).

Aujourd'hui, les phytovirus sont très étudiés et on connaît de nombreux virus pouvant infecter de nombreuses plantes cultivées. Certains virus ont une gamme d'hôtes 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 telles que le houblon, la betterave, les ronces, etc...

b - Classification des virus de la vigne

La taxonomie permet de différencier et de nommer les différentes entités virales. Plusieurs classifications peuvent exister selon les objectifs poursuivis. Pour cela il faut choisir des paramètres adéquats. Les relations entre les virus et leurs hôtes se manifestent par des symptomatologies différentes qui peuvent être le paramètre de classification choisi dans un objectif de diagnostic.

La classification moléculaire des virus ne tient pas compte de la symptomatologie ou de la gamme d'hôtes du virus, mais elle se base sur les relations phylogénétiques, c'est-à-dire qu'elle identifie les virus en fonction de leur organisation génomique et des homologies de séquences rencontrées.

Au départ, la classification était basée sur ce que l'on connaissait, c'est-à-dire les caractères morphologiques (type de particule, cytopathologie et inclusions) et biologiques (gamme d'hôte, vecteur des virus...) puis elle a dévié vers une approche plus moléculaire (séquences génomiques et des protéines) avec les progrès de la génétique.

Cependant cette évolution n'a pas entraîné de modification au sein des genres et des familles. Par contre elle a permis de redéfinir des espèces ou des souches (LEPOIVRE P., 2003). La classification des phytovirus repose désormais sur une dénomination binomiale. Elle inclut un nom de genre suivi d'un nom d'espèce. Comme nous venons de le mentionner, il peut exister différentes souche d'un même virus. Ces souches peuvent avoir un pouvoir pathogène (ou virulence) différent sur une plante donnée. Elles se distinguent alors par leurs effets pathologiques (symptômes, dégâts), on parle de pathotype. Il existe donc des souches dites hypovirulentes qui provoquent peu de dégâts et, à l'inverse, des souches dites hypervirulentes.

A l'heure actuelle 58 virus infectant la vigne ont été décrits ainsi que 5 viroïdes (MARTELLI G.P. et BOUDON-PADIEU E., 2006). L'impact économique de ces maladies dans le monde viti-vinicole peut-être énorme et de ce fait la recherche dans ce domaine est très active. L'importance des dommages varie beaucoup en fonction du virus et de l'isolat viral, de la structure des sols et du climat (conditions pédo-climatiques), du cépage (BOVEY *et al.*, 1990 ; MARTELLI et SAVINO, 1990). Dans certains cas, la présence de vecteurs capables de disséminer ces viroses est également primordiale d'un point de vue épidémiologique. La maîtrise de ces maladies fait donc appel à des connaissances très pluridisciplinaires.

Les virus qui peuvent infecter la vigne sont représentés dans le tableau suivant.

Famille	Genre	Espèce	
<i>Virus appartenant à des genres classés en familles</i>			
BROMOVIRIDAE	<i>Alfavirus</i>	Alfalfa mosaic	(AMV)
	<i>Cucumovirus</i>	Cucumber mosaic	(CMV)
	<i>Ilarvirus</i>	Grapevine line pattern Grapevine angular mosaic virus	(GLPV) (GAMoV)
BUNYAVIRIDAE	<i>Tospovirus</i>	Tomato spotted wilt virus	(TSWV)
CLOSTEROVIRIDAE	<i>Closterovirus</i>	Gr. leafroll-associated virus 2	(GLRaV-2)
	<i>Ampelovirus</i>	Gr. leafroll-associated virus 1 Gr. leafroll-associated virus 3 Gr. leafroll-associated virus 4 Gr. leafroll-associated virus 5 Gr. leafroll-associated virus 6 Gr. leafroll-associated virus 7 Gr. leafroll-associated virus 8 Gr. leafroll-associated virus 9 Gr. leafroll-associated virus 10	(GLRaV-1) (GLRaV-3) (GLRaV-4) (GLRaV-5) (GLRaV-6) (GLRaV-7) (GLRaV-8) (GLRaV-9) (GLRaV-10)
Un nouvel <i>Ampelovirus</i> présumé pourrait venir intégrer ce genre			
COMOVIRIDAE	<i>Fabavirus</i>	Broadbean wilt virus	(BBWV)
	<i>Nepovirus</i>	Artichoke Italian latent virus Arabidopsis mosaic virus Blueberry leaf mottle virus Cherry leafroll virus Gr. Bulgarian latent virus Gr. Anatolian ringspot virus Gr. Deformation virus Gr. Chrome mosaic virus Gr. Fanleaf virus Gr. Tunisian ringspot virus Peach rosette mosaic virus Raspberry ringspot virus Tobacco ringspot virus Tomato ringspot virus Tomato blackring virus	(AILV) (ArMV) (BBLMoV) (CLRV) (GBLV) (GARSV) (GDefV) (GCMV) (GFLV) (GTRSV) (PRMV) (RpRSV) (TRSV) (ToRSV) (TBRV)
FLEXIVIRIDAE	<i>Foveavirus</i>	Gr. Rupestris stem pitting-associated virus	(GRSPaV)

	<i>Potexvirus</i>	Potato virus X	(PVX)
	<i>Trichovirus</i>	Gr. Berry inner necrosis virus	(GINV)
	<i>Vitivirus</i>	Grapevine virus A Grapevine virus B Grapevine virus C Grapevine virus D	(GVA) (GVB) (GVC) (GVD)
TOMBUSVIRIDAE	<i>Tombusvirus</i>	Petunia asteroid mosaic virus Grapevine Algerian latent virus	(PAMV) (GALV)
	<i>Carmovirus</i>	Carnation mottle virus	(CarMV)
	<i>Necrovirus</i>	Tobacco necrosis virus D	(TNV-D)
TYMOVIRIDAE	<i>Marafivirus</i>	Gr. asteroid mosaic-associated virus Gr. red globe virus	(GAMaV) (GRGV)
	<i>Maculavirus</i>	Gr. fleck virus Gr. rupestris vein feathering virus	(GFkV) (GRVfV)
Un nouveau virus pourrait intégrer les <i>Marafivirus</i> (en étude actuellement aux USA)			
POTYVIRIDAE	<i>Potyvirus</i> (?)	Virus non identifié apparenté aux <i>Potyvirus</i> , isolé au Japon	
<i>Virus appartenant à des genres qui ne sont pas classés en familles</i>			
	<i>Idaeovirus</i>	Raspberry bushy dwarf virus	(RBDV)
	<i>Sadwavirus</i>	Strawberry latent ringspot virus	(SLRSV)
	<i>Sobemovirus</i>	Sowbane mosaic virus	(SoMV)
	<i>Tobamovirus</i>	Tobacco mosaic virus Tomato mosaic virus	(TMV) (ToMV)
<i>Virus qui ne sont pas classés taxonomiquement</i>			
		Grapevine ajinashika virus Grapevine stunt virus Grapevine labile rod-shaped virus Particule filamenteuse non nommée	(GAV) (GSV) (GLRSV)

Tableau 1 - Les virus de la vigne et leur classification systématique (source : BOUDIEU- PADIEU E. et al ; extended abstracts 15th Meeting ICVG, 2006).

2 - Transmission

Il existe trois grandes modalités de dissémination des virus des plantes (WALTER B. *et al.*, 2000) :

- par des organes ou tissus nécessaires à la reproduction végétative ou à la reproduction sexuée.
- par des vecteurs animaux qui se nourrissent sur les plantes.
- Par contact.

a - La dissémination par des organes ou tissus nécessaires à la reproduction végétative.

i - Le bouturage

Il consiste à mettre en terre une partie de plante, en général un rameau qui va ensuite donner une plante entière grâce à la totipotence des cellules végétales. La totipotence est la capacité qu'ont les cellules végétales à redonner un organisme entier à partir de cellules différenciées. Juste un petit aparté historique pour illustrer cette propriété fascinante. Le premier à avoir énoncé la théorie de la totipotence cellulaire est Haberlandt (botaniste et biologiste Autrichien). Il se basait justement sur des observations dans le cas du bouturage : des cellules de tige pouvaient donner des racines. C'est ensuite dans les années 1970 que l'isolement de protoplastes puis leur culture et celle de cellules complètement isolées a permis la démonstration absolue de la totipotence végétale. Des cellules de parenchyme chlorophyllien de feuille de tabac (donc très différenciées) étaient capables de se dédifférencier, de redonner un cal puis, selon la balance hormonale proposée, donner des racines, des feuilles, et régénérer un végétal entier.

ii - Le greffage

Il s'agit ici de souder une partie de plante (le greffon) sur une autre plante appelée le porte-greffe. Il existe de nombreuses techniques de greffage qui vont avoir une influence sur la rapidité d'expression des symptômes de la virose ainsi transmise. Nous verrons que ceci a

une importance dans le domaine du dépistage des maladies virales et notamment pour la méthode que l'on appelle l'indexage biologique. Nous décrivons cette méthode plus loin et détaillerons les techniques mises en œuvre qui consistent à transmettre par greffage le virus à une variété indicatrice qui est connue pour bien exprimer les symptômes.

iii- Les bulbes ou les caïeux

Les virus sont présents dans les cellules des bulbes et caïeux. Lors de la repousse de la plante le virus passe de cellule à cellule pour contaminer les différents tissus.

b - La dissémination par des organes ou tissus nécessaires à la reproduction sexuée

Ce mode de dissémination par le pollen ou la graine est beaucoup plus anecdotique. Le taux de transmission dépend du virus et de l'espèce végétale infectée et seul un petit nombre de virus est concerné. Pour note, et pour son importance économique et alimentaire, nous pouvons citer le Barley stripe mosaic virus du genre *Hordeivirus* qui est connu pour être facilement disséminé par le pollen. Ce virus n'affecte pas la vigne mais l'orge comme son nom l'indique (barley) et le blé. Sa répartition est probablement mondiale. (BRUNT A.A. *et al.*, 1996 ; Oregon department of agriculture, 2007).

c - La dissémination par des vecteurs animaux qui se nourrissent sur les plantes

La majorité des virus utilisent ce mode de transmission pour se propager d'hôtes en hôtes. Les vecteurs mobiles sont le plus souvent des ravageurs ou des parasites des plantes. Ils sont présents dans le sol ou alors aériens dans la majeure partie des cas.

Les vecteurs présents dans le sol : certaines espèces de nématodes et de champignons transmettent les virus au niveau des racines. Les nématodes ectoparasites souterrains ne transmettent que deux genres de virus, les *Tobravirus* et les *Nepovirus* (DEMANGEAT G., 2007). Ces vecteurs souterrains ont une mobilité réduite. Ils propagent la maladie lentement à partir de foyers.

Les vecteurs aériens sont essentiellement des insectes et des acariens. A l'inverse des précédents ils sont très mobiles et peuvent provoquer des infections épidémiques.

d - La dissémination par contact direct

Elle se fait surtout à la suite de blessures résultant de frottements entre feuilles ou entre rameaux sous l'effet du vent. Dans les conditions naturelles ce mode de transmission est rare. Par contre il est utilisé, comme nous le verrons, dans des conditions expérimentales pour multiplier des virus sur des hôtes à des fins d'étude.

Lorsque que l'on parle de la transmission des virus il ne faut bien sûr pas oublier les sources de la contamination encore appelées sources d'inoculum. Dans le cas des espèces à reproduction végétative dont la vigne fait partie, les bois et plants atteints peuvent être une source importante de contamination par certain virus. Les populations de vecteurs souterrains peuvent également constituer des réservoirs d'*inoculum*. Ce cas nous intéresse tout particulièrement puisque les virus du court-noué sont transmis par des nématodes vecteurs présents dans les sols viticoles. Les plantes autres que la vigne présentes dans le vignoble peuvent elles aussi être des réservoirs de virus. Il peut s'agir de repousses de plantes cultivées ou bien d'adventices qui peuplent naturellement le territoire viticole (WALTER B. *et al.*, 2000).

C - Les différentes viroses de la vigne.

Dans ce chapitre, les descriptions des maladies sont tirées des extraits étendus des dernières conférences de l'ICVG comportant chacun une centaine d'articles (extended abstracts 14th and 15th meeting ICVG) ainsi que des articles suivant : (Australian government, 2004 ; FAO/IBPGR, 2008 ; HABIL N. et MONIS J., 2006 ; MARTELLI G.-P., 1993 ; MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006 ; MARTINSON T. et al., 2008 ; JOHNSON R.-C., 2003 ; NICHOLAS P., 2006 (a) et (b)).

1 – Les viroses majeures de la vigne

A l'heure actuelle, on connaît plus de 70 agents infectieux de la vigne dont 58 virus, 5 viroïdes, 8 phytoplasmes et 1 bactérie xylématique transmise par un insecte d'après le dernier rapport bibliographique du CIHEAM (Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes) (MARTELLI et BOUDON-PADIEU E., 2006). Ceci représente le plus grand nombre de pathogènes intracellulaires jamais rencontrés sur une seule culture. En ce qui concerne les virus, il n'existe probablement pas d'autres espèces ligneuses capables d'héberger autant d'espèces virales différentes appartenant à des genres variés. Ces virus peuvent être de véritables pathogènes responsables de dommages importants sur la vigne, ou bien, pour certains, des pathogènes très dommageables d'autres espèces végétales cultivées infectant aussi la vigne mais provoquant peu de dégâts sur celle-ci, soit parce qu'ils n'infectent que rarement cette espèce, soit parce que les dommages occasionnés sont faibles.

Parmi les viroses les plus répandues et les plus dommageables à la vigne se trouvent :

- le court-noué (fanleaf degeneration) et les autres formes de dégénérescence et de dépérissement infectieux ;
- l'enroulement viral ;
- le complexe du bois strié.

a – Court-noué, dégénérescence et dépérissement

15 virus différents sont responsables de syndrômes de dégénérescence ou de dépérissement (cf tableau 2). Tous appartiennent au genre *Nepovirus* à l'exception du Strawberry Latent Ringspot Virus (SLRSV) appartenant à l'origine au groupe des *Nepovirus* qui a été assigné à un nouveau genre en 2005, le genre *Sadwavirus* (LE GALL O. et al., 2005 ; 2007). Ils sont transmis par des nématodes du sol lors de la prise alimentaire, avec ici encore une exception pour le CLRV qui est transmis par le pollen des plantes contaminées. Un 15^{ème} *Nepovirus* dont les conséquences pathologiques restent incertaines a été trouvé en Tunisie : c'est le Grapevine Tunisian Ringspot Virus (GTRV).

Le Grapevine Fanleaf *Nepovirus* est le virus responsable de la maladie du court-noué *stricto-sensu* : sa répartition est mondiale et il est transmis spécifiquement par le nématode *Xiphinema index*. A côté du GFLV seul un deuxième *Nepovirus* est connu dans les vignobles français : l'Arabis Mosaic Virus (ArMV) (WALTER B. et al., 2000). Les symptômes

provoqués par l'ArMV sont similaires, voire dans la plupart des cas indifférentiables de ceux provoqués par le GFLV. Ainsi tout au long de cette thèse nous parlerons du « complexe du court-noué » pour désigner les deux virus responsables de dégénérescence infectieuse en France. A côté du GFLV et de l'ArMV responsables de la maladie du court-noué, il existe d'autres *Nepovirus* à l'origine de dégénérescence infectieuse et des *Nepovirus* induisant le syndrome du dépérissement infectieux. Nous comprenons donc que le terme de court-noué n'a pas de traduction internationale et qu'il définit en fait la dégénérescence infectieuse telle qu'elle se caractérise dans les vignobles français. La terminologie anglo-saxonne est plus précise et elle différencie la virose provoquée par le GFLV, nommée « Fanleaf » ou « Fanleaf disease », des dégénérescences infectieuses provoquées par les autres *Nepovirus*, appelées « infectious degeneration ». Ces virus responsables de dégénérescence infectieuse sont appelés *Nepovirus* européens ou méditerranéens par opposition aux *Nepovirus* américains responsables du dépérissement (Grapevine degeneration and decline). Cette dénomination découle tout simplement de l'origine géographique de ces virus. Ils sont séparés en 3 sous-groupes A, B et C au sein du genre *Nepovirus* qui ont été établis d'après les propriétés physico-chimiques des virus en se basant sur 3 structures virales types. Les virus types des sous-groupes A, B et C sont respectivement le Tobacco Ringspot Virus (TRSV), le Tomato Black Ring Virus (TBRV) et le Tomato Ringspot Virus (ToRSV).

Si, comme nous l'avons dit plus haut, les symptômes causés par l'ArMV sont souvent indifférentiables de ceux provoqués par le GFLV (Fanleaf disease), c'est également le cas pour les autres *Nepovirus* européens. En effet, la plupart de ces virus ont, comme le GFLV, des souches chromogènes et des souches déformantes que nous détaillerons dans la deuxième partie (cf symptômes). Ils peuvent également se retrouver sur la vigne en infections mixtes avec le GFLV. Les quatre *Nepovirus* responsables des maladies du dépérissement n'ont été décrits jusque-là qu'aux USA et au Canada, d'où leur nom de *Nepovirus* américains. Il existe plusieurs synonymes pour le dépérissement infectieux : en français on parle aussi de jaunissement des nervures, alors qu'en Anglais différents termes peuvent être employés : Grapevine degeneration, yellow vein, grapevine decline, little grape.

i – les virus en cause

Le tableau page suivante présente les *Nepovirus* infectant la vigne, leur localisation et leurs vecteurs associés. D'après WALTER B. *et al.*, 2000 ; MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006 ; FAO/IBPGR, 2008 ; MARTELLI G.-P., 1993.

Virus	Nematodes vecteurs	Localisation
Dégénérescence		
AILV (Artichoke Italien Latent)	<i>L. apulus</i> <i>L. fasciatus</i>	Bulgarie
ArMV (Arabis Mosaic)	<i>X. diversicaudatum</i>	Allemagne, Bulgarie, Croatie, France, Hongrie, Israël, Italie, Japon, Serbie, Suisse, Turquie, Ukraine, USA
CLRV (Cherry leafroll virus)	sans doute aucun et transmission par pollen	Monde
GARSV (Grapevine Anatolian Ringspot Virus)	<u>inc.</u>	Turquie (sud-est du pays)
GBLV (Grapevine Bulgarian Latent)	<u>inc.</u>	Bulgarie, Croatie, Hongrie, Portugal
GCMV (Grapevine Chrome Mosaic)	<u>inc.</u>	Autriche, Croatie, Hongrie, Tchécoslovaquie Turquie (sud-est du pays)
GDefV (Grapevine Deformation Virus)	<u>inc.</u>	Turquie (sud-est du pays)
GFLV (Grapevine Fanleaf)	<i>X. index</i>	Monde
RRV ou RpRSV (Raspberry Ringspot)	<i>L. macrosoma</i> <i>L. elongatus</i> <i>P. maximus</i>	Allemagne, Suisse
SLRSV (Strawberry Latent Ringspot) appartenant aux <i>Sadwavirus</i>	<i>X. diversicaudatum</i>	Allemagne, Italie, Portugal, Tchécoslovaquie, Turquie
TBRV (Tomato Black Ring)	<i>L. attenuatus</i> <i>L. elongatus</i>	Allemagne, Canada, Croatie, France, Grèce, Hongrie, Israël
Dépérissement		
BBLMV ou BLMoV (Blueberry Leaf Mottle)	<u>inc.</u> (suspicion de transmission par pollen)	<u>inc.</u>
PRMV (Peach Rosette Mosaic)	<i>X. americanum</i> <i>L. diatecturus</i> <i>L. elongatus</i>	Canada, USA
ToRSV (Tomato Ringspot)	<i>X. californicum</i> <i>X. rivesi</i>	Canada, USA, Slovaquie ?
TRSV (Tobacco ringspot)	<i>X. americanum (sensu stricto)</i>	Canada, USA
Pathogénicité mal connue		
GTRSV (Grapevine Tunisian Ringspot)	<u>inc.</u>	Tunisie

Tableau 2 : Nepovirus (et Sadwavirus) responsables de dégénérescence et de dépérissement infectieux.

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

ii - symptômes

Les symptômes provoqués par les *Nepovirus* sur la vigne sont du même type pour toutes les infections. Il s'agit de déformations et diminutions de la taille des feuilles, d'altérations chromatiques, de raccourcissements des entre-nœuds, double-nœuds, fasciations (applatissements des sarments), de diminutions du nombre et de la taille des grappes, de coulures et millerandages (cf. partie II, symptômes). Quel que soit le virus infectant la vigne, les symptômes et les dégâts provoqués varient avec le cépage, l'isolat viral, le porte-greffe et les conditions climatiques.

Nous allons, dans les quelques lignes qui suivent résumer brièvement la symptomatologie des maladies du dépérissement dont nous ne reparlerons plus au cours de ce document.

L'infection par le ToRSV et par le TRSV induisent, sous les climats froids (état de New-York et Ontario), tous les symptômes énumérés juste avant. Sous les climats chauds (Maryland, Californie), la production seule est affectée mais pas la vigueur de la vigne.

Le Peach Rosette Mosaic Virus (PRMV) est responsable d'un syndrome sévère sur *V. labrusca* caractérisé par un éclatement des bourgeons, des malformations et une panachure des feuilles, ainsi qu'une récolte amoindrie. Les vignes infectées déclinent lentement au cours du temps.

Le Blueberry Leaf Mottle Virus (BLMoV ou BBLMV) provoque des infections latentes sur les cépages européens alors qu'il induit sur *V. labrusca* cv. Concord un éclatement des bourgeons, des symptômes fanleaf-like sur les feuilles et les sarments et une diminution de la récolte.

Nous n'allons pas détailler ici les différents syndromes de dégénérescence infectieuse induit par les 10 *Nepovirus* européens et par le SLRSV (*Sadwavirus*), mais nous préciserons, dans la deuxième partie, les symptômes du court-noué que l'on pourra rapprocher de ceux des autres dégénérescences infectieuses.

b - L'enroulement viral ou complexe de l'enroulement

L'enroulement viral n'est pas moins important que le court-noué ou fanleaf disease provoqué par le GFLV. L'incidence économique de cette maladie est comparable à celle de l'infection par le GFLV, et c'est probablement la maladie virale la plus répandue dans le monde, où elle n'épargne quasiment aucun vignoble.

i – les virus en cause

Aujourd'hui, 10 virus différents avec des particules filamenteuses ont été trouvés dans des vignes portant des symptômes d'enroulement (MARTINSON T. *et al.*, 2008). Ils sont appelés Grapevine Leafroll-associated viruses (GLRaVs), et sont différenciés les uns des autres par un numéro de 1 à 10. Tous les GLRaVs appartiennent à la famille des *Closteroviridae*. D'autre part, un *Potyvirus* isolé en Israël sur des vignes développant un enroulement est actuellement étudié comme un éventuel contaminant.

Les GLRaV-1 et -3 sont probablement les plus répandus des virus liés à l'enroulement et ceux qui provoquent les symptômes les plus graves. Ils sont présents dans tous les vignobles français. Le GLRaV-2 semble plus circonscrit à certains cépages. Il est aussi associé à des cas d'incompatibilité au greffage (WALTER B. *et al.*, 2000).

ii – transmission

La transmission de l'enroulement se fait par greffage et l'infection persiste dans le matériel de propagation qui est largement responsable de la contamination à moyenne et longue distance. La dissémination sur un site est assurée par des cochenilles ou des insectes volants. Ce type de dissémination naturelle en champ a été rapportée dans beaucoup de pays d'Europe et dans d'autres régions du monde (MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006). Plusieurs cochenilles et insectes sont responsables de la vexion des virus et seuls les vecteurs du GLRaV-1, -3, -5, et -9 sont pour l'instant identifiés avec certitude et on peut penser que tous ne sont pas encore connus pour ces virus. Pour les autres GLRaVs, différentes espèces de cochenilles ou insectes volants peuvent transmettre les virus, mais leur rôle dans la transmission au vignoble n'est pas encore clairement établi. Pour les vecteurs bien connus, la transmission se fait selon le mode semi-persistant et ne semble pas vecteur-spécifique.

iii – symptômes

Sur les cépages européens l'enroulement viral s'exprime par un enroulement des feuilles vers le bas accompagné d'un rougissement des limbes sur cépages rouges et d'un jaunissement sur cépages blancs. L'enroulement reste latent chez la plupart des vignes américaines et leurs hybrides. Sur les variétés de porte-greffe, les virus de l'enroulement ne produisent généralement aucun symptôme ce qui augmente les risques de dissémination à partir des porte-greffes. Les 10 GLRaVs sont des virus qui induisent des symptômes similaires dans les vignes infectées. Ils colonisent et se reproduisent dans le tissu phloématique des plantes ce qui interrompt le flux de nutriment vers les tiges, les feuilles et les pédicèles des fruits. Ce dysfonctionnement du transport phloématique réduit la vigueur et empêche l'accumulation des sucres et autres métabolites dans le fruit (HABILI N. et MONIS J., 2006). La productivité des vignes infectées peut ainsi être diminuée de 30 à 50% et les raisins des ceps atteints mûrissent tardivement et de façon irrégulière. Les vins rouges produits par des vignes infectées ont moins de couleur par diminution du taux d'antocyanes dans les raisins (MARTINSON T. *et al.*, 2006). Les symptômes caractéristiques sont visibles sur les feuilles (cf photo 1) avec un enroulement vers le bas des bords du limbe. Sur les cépages rouges de *V. vinifera*, des taches rouges apparaissent dès les mois de juin-juillet sur les feuilles de la partie inférieure des sarments. Ce rougissement, d'abord partiel, s'étend à toute la surface du limbe, à l'exception d'une fine bande qui reste verte le long des nervure primaires et secondaires. Le limbe s'épaissit et s'enroule vers le bas. Les symptômes s'étendent vers le haut des pousses. A l'automne, les feuilles les plus atteintes brunissent et présentent une nécrose de l'épiderme supérieur. Sur les cépages blancs les symptômes sont identiques, sauf que les feuilles ne présentent pas de rougissement, mais un jaunissement plus ou moins prononcé (WALTER B. *et al.*, 2000 ; MARTELLI G.-P., 1993 ; MARTINSON T. *et al.*, 2006 ; HABILI N. et MONIS J., 2006).



Photo 1: symptômes sévères d'enroulement sur merlot (photo : BOVEY R., source ICVG)

c – Le complexe du bois strié (rugose wood complex).

Le complexe du bois strié se divise en 4 maladies différentes distinguées par les symptômes qu'elles induisent sur les variétés indicatrices :

- Grapevine Rupestris Stem Pitting (RSP)
- Kobber stem grooving (KSG)
- Grapevine corky bark (CB)
- Grapevine LN 33 stem grooving

Dans la plupart des cas, les symptômes de bois strié ne se manifestent que sur les porte-greffes américains. De nombreux cépages européens ne montrent pas de symptôme quand ils sont infectés. Ces infections sont habituellement latentes sur *Vitis vinifera* et les espèces américaines de *Vitis* non greffés ainsi que sur les porte-greffes hybrides. Les symptômes, lorsqu'ils apparaissent, ne se développent qu'après greffage, ce qui permet de qualifier le bois strié de maladie d'assemblage. Toutefois, plusieurs cas de symptômes graves de bois strié ont été rapportés sur des *Vitis vinifera* francs de pied.

i – Virus en cause

Les agents viraux probables associés aux différentes maladies du bois strié sont des membres des genres *Vitivirus* ou *Foveavirus* appartenant à la famille des *Flexiviridae*, c'est-à-dire des virus à particules flexueuses filamenteuses. Les *Vitivirus* et *Foveavirus* sont restreints au phloème.

Le Grapevine Rupestris Stem Pitting-associated Virus (GRSPaV) est associé au RSP et appartient au genre *Foveavirus*.

Le GVA (Grapevine virus A) du genre *Vitivirus* est aujourd'hui associé de façon certaine au KSG grâce à l'apparition de symptômes de KSG sur Kobber 5 BB après inoculation par hétérogreffage avec des *Nicotiana benthamiana* infectés par le GVA. D'autre part, le GVA est relié depuis peu à la maladie du dépérissement de la Syrah sévissant en Afrique du Sud et Australie. Les premières publications rapportant cette information ont émané de la 16^{ème} conférence de l'ICVG en 2006 (HABILI N. et MONIS J., 2006).

Le GVB (Grapevine virus B) paraît actuellement associé à l'écorce liégeuse (corky bark) de façon quasi certaine. Il n'est pas le seul agent responsable de ce syndrome. Le GVC (Grapevine virus C), peu connu et mal caractérisé ainsi que le GVD (Grapevine virus D) sont aujourd'hui également associés au CB. Cependant, il reste beaucoup d'incertitudes concernant l'étiologie du CB et le rôle de ces deux virus dans la maladie. Même si leur incrimination dans ce syndrome n'est plus seulement hypothétique comme il y a une dizaine d'années (WALTER B. *et al.*, 2000 ; extended abstract 15th Meeting ICVG), elle n'est pas encore fondamentalement bien prouvée.

Il n'existe pas actuellement d'information sur la nature du virus responsable du LN 33 stem grooving.

ii – Transmission

Pendant de nombreuses années après la découverte de ces maladies, aucun cas de dissémination naturelle n'a été enregistré. Les premières observations d'une possible dissémination au vignoble ont été faites au Mexique. Aujourd'hui, il a été démontré que le GVA et le GVB peuvent être transmis par des cochenilles et/ou des insectes volants selon un mode semi-persistant. Trois cochenilles sont connues pour être vectrices du GVB mais un modèle mathématique étudiant la diffusion de l'écorce liégeuse en Israël suggère que la maladie est probablement transmise aussi par un vecteur aérien.

iii – symptômes

De façon générale, les maladies du bois strié se manifestent par une diminution de la taille et de la vigueur, un retard au débourrement et un dépérissement. Les symptômes caractéristiques se trouvent en dessous de l'écorce, sur le cylindre du bois. Ils se présentent sous forme de striures et de cannelures dont la sévérité dépend de l'assemblage greffon / porte-greffe. Au vignoble, seuls quelques cépages extériorisent les symptômes, l'infection restant souvent latente comme nous l'avons dit en introduction. Les symptômes sur bois peuvent apparaître soit sur le greffon, soit sur le porte-greffe, soit sur les deux (cf photos 2 à 4).



Photo 2 : symptômes de bois strié uniquement sur greffon. (Photo MARTELLI G.-P., 1993)



Photo 3 : symptômes uniquement sur porte-greffe. (Photo MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006)

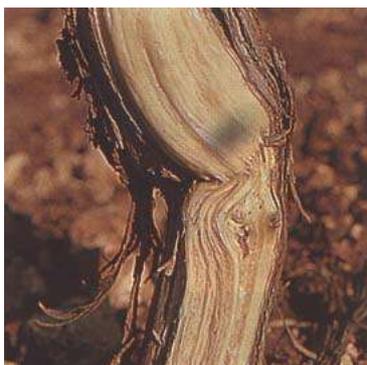


Photo 4 : porte-greffe et greffon développent les symptômes. (Photo MARTELLI G.-P., 1993)

Souvent un épaissement est visible au dessus du point de greffe donnant l'aspect d'une tumeur avec une différence de diamètre importante entre le greffon et le porte-greffe (cf photo 5). Attention cependant car cette différence de diamètre n'est pas obligatoirement pathologique et se rencontre sur toutes les vignes greffées, d'autant plus qu'elles sont jeunes. En effet, en général, le greffon grossi plus vite que le porte-greffe. L'aspect n'est cependant pas le même, le greffon ayant un diamètre à peu près constant dans le cas d'assemblages sains, alors que l'on observe seulement une boule au dessus du point de greffe dans les cas pathologiques. Les altérations du bois varient de cannelures à striures. Les striures sont creuses et de petites dimensions, alors que les cannelures sont profondes et longues accompagnées de protubérances de la face interne de l'écorce. Celle-ci revêt un aspect liégeux et spongieux dans le cas du corky bark. Le rendement en raisin, le développement des racines et la reprise au greffage sont diminués. Les vignes infectées peuvent dépérir et mourir quelques années après la plantation.



Photo 5 : apparence liégeuse de l'écorce et épaissement au dessus du point de greffe (photo : MARTELLI G.-P.)

Pour être un petit peu plus précis, après la description des symptômes généraux communs, nous allons préciser les quelques caractéristiques de chacune des 4 maladies du complexe :

- RSP : Les cannelures sont distinctes, basipètes, limitées à une bande s'étendant vers le pied à partir du point d'infection. LN 33 et Kober 5 BB restent asymptomatiques.



Photo 6 : RSP. Extension basipète des cannelures depuis le point d'inoculation. (Photo : GOHEEN A.C.)

- CB : On note l'apparition de cannelures et striures sur la surface entière du tronc sur rupestris et LN 33. Kober 5 BB reste asymptomatique. Sur LN 33 les infections sévères sont accompagnées d'un enroulement et rougissement des feuilles et par un éclatement typique des rameaux entre les nœuds (photos 7 et 8).



Photo 7 : Symptômes sévères de Corky barck. Rabougrissement et rougissement des feuilles. (Photo MARTELLI G.-P., 1993)



Photo 8 : Raccourcissement et éclatement typique des entre-nœuds dans un Corky Bark sévère. (Photo : MARTELLI G.-P., 1993)

- KSG : se traduit par l'apparition de cannelures profondes sur tronc de Kobber 5 BB. Il n'y a pas de symptômes sur *V. rupestris* et LN 33.



Photo 9 : Cannelures sur le porte-greffe Kobber 5 BB. (Photo : MARTELLI G.-P., 1993)

- LN 33 stem grooving : les cannelures apparaissent sur le tronc de LN 33 avec les mêmes symptômes que ceux du CB mais sans les symptômes foliaires et l'éclatement des sarments. *Vitis rupestris* et Kobber 5 BB ne développent pas les symptômes.

Les dégénérescences infectieuses et le dépérissement, le complexe de l'enroulement et le complexe du bois strié représentent les trois grands types d'atteintes virales de la vigne en termes de gravité. Ce sont, à l'heure actuelle, avec le dépérissement de la Sirah, les viroses les plus préjudiciables à l'économie de la filière viti-vinicole. Cependant deux autres grandes viroses, la marbrure et l'incompatibilité au greffage, ne peuvent être exclues des maladies virales que l'on a qualifiées de majeures pour la vigne. D'autre part, l'incompatibilité au greffage est un syndrome en extension dans les vignobles du monde entier, et revêt une importance agronomique et économique de plus en plus prépondérante pour la viticulture.

d – la marbrure ou complexe de la marbrure (fleck complex)

A l'heure actuelle le complexe de la marbrure est considéré comme le regroupement de plusieurs maladies (Grapevine fleck, Grapevine asteroid mosaic, grapevine rupestris necrosis et grapevine rupestris vine feathering) associées à différents virus. Ce complexe est largement répandu à l'état latent ou semi-latent dans de nombreux cépages de *Vitis vinifera*, dans la plupart des *Vitis* américains et les porte-greffes hybrides. La nature de ce complexe reste très vague (cf virus en cause), empêchant l'évaluation de son impact économique. Cependant, une influence négative sur la vigueur de la vigne, la capacité d'enracinement des porte-greffes et la reprise au greffage sont rapportées.

i – les virus en cause

La marbrure a pendant longtemps été considérée comme une maladie due à un seul virus, le GFkV (Grapevine fleck virus) qui est d'ailleurs toujours appelé virus de la marbrure (WALTER B. *et al.*, 2000). Au début des années 2000 différentes observations ont permis de rapprocher ce virus des genres *Tymovirus* et *Marafivirus*. A la suite de cela, il a été proposé 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, ainsi que le GAMaV (Grapevine asteroid mosaic-associated virus) et le GRGV (Grapevine red globe virus) (WALTER B. *et al.*, 2000). Dès lors, on a commencé à parler de complexe de la marbrure pour regrouper ces différentes infections au sein d'un grand syndrome. Finalement, en se basant sur ses caractéristiques moléculaires, le GFkV a été identifié comme le représentant d'un nouveau genre dénommé *Maculavirus*. A côté du GFkV, le GAMaV et le GRGV ont été

assignés au genre *Marafivirus*. D'autre part, les études physico-chimiques, moléculaires et ultrastructurales de ces virus ont rapportées suffisamment de similitudes entre les *Maculavirus*, *Marafivirus* et les membres du genre *Tymovirus* pour aboutir à l'établissement d'une nouvelle famille appelée *Tymoviridae* (MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006). En 2008, la classification taxonomique courante pour les virus du complexe de la marbrure est la suivante :

Famille *Tymoviridae*

Genre *Marafivirus*

Grapevine asteroid mosaic-associated virus

Grapevine rupestris vein feathering virus

Genre *Maculavirus*

Grapevine fleck virus

Grapevine red globe virus

Tous les virus du complexe sont limités au phloème et ne sont pas transmissibles mécaniquement.

ii - Transmission

A ce jour, aucun vecteur n'est connu pour les différents virus du complexe de la marbrure. Des observations au vignoble en Italie, Afrique du Sud et Japon suggèrent cependant une dissémination naturelle au champ du GFkV. Le matériel végétal reste quand même probablement la principale source de contamination s'il n'est pas contrôlé vis-vis de la marbrure. En France, la certification des clones de porte-greffes prend en compte la marbrure, mais ce n'est pas le cas pour la certification des cépages. Ceci est peut-être amené à changer car les dégâts sont probablement sous-estimés. Le GFkV n'est, à priori, pas transmis par les graines (extended abstracts of the 16th conference of ICVG, 2006).

iii – Symptômes

- La marbrure *stricto-sensu* (fleck) se manifeste, notamment sur *V. rupestris* « du lot » ou « Saint-Georges » qui servent d'indicateurs, par un éclaircissement des nervures tertiaires avec un repliement du limbe vers la face supérieure, formant une gouttière (photo 10). Les souches virulentes du GFkV peuvent provoquer différents degrés de

rabougrissements. La marbrure est rapportée dans tous les vignobles du monde. Les autres formes de maladies du complexe présentent des différences de symptomatologie et différentes localisations géographiques.



Photo 10 : Eclaircissement typique des nervures sur *Vitis rupestris*. (Photo MARTELLI G.-P. dans FAO/IBPGR, 2008)

- Asteroid mosaic. On peut trouver ce terme traduit en français par « la mosaïque étoilée ». Sur *V. vinifera* les symptômes foliaires se traduisent par des taches chlorotiques en forme d'étoile, parfois nécrosées au centre, et disposées irrégulièrement sur la surface de la feuille. Les feuilles sont asymétriques, enroulées et plissées le long des nervures (Photo 11). Les vignes infectées sont souvent rabougries. Des symptômes de mosaïque étoilée ont été rapportés en Californie et en Afrique du sud, mais le GAMaV, agent probable de la maladie, n'a été isolé qu'en Californie (extended abstracts of the 16th conference of ICVG, 2006).



Photo 11 : Asteroid mosaic. Le plissement de la feuille le long des nervures est très remarquable. (Photo MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006)

- Rupestris necrosis. Cette maladie est latente dans les variétés européennes et n'a été mise en évidence pour l'instant qu'au Japon (extended abstracts of the 16th conference of ICVG, 2006).
- Rupestris vein feathering. Les vignes atteintes sont des variétés européennes et présentent des symptômes semblables à la mosaïque étoilée, mais d'intensité plus faible. Des décolorations transitoires des veines primaires et secondaires sont remarquées sur *rupestris* après l'inoculation par greffage. L'agent causal suspecté (GRVFV) a été isolé sur vigne en Grèce, Italie et Californie.
- Le Grapevine red globe virus n'est pas mis en cause dans un syndrome particulier. Il est apparenté au GFkV et ne provoque apparemment pas de symptôme sur les variétés européennes et *V. rupestris* (MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006). Il a été isolé pour l'instant en Californie et en Italie, mais pourrait bien être présent dans tous les vignobles du monde, comme le GFkV.

e –L'incompatibilité au greffage

L'infection par des virus limités au phloème peut causer des dommages en pépinières (diminution de la reprise au greffage) ou au champ dans les premières années de développement de la vigne (incompatibilité au greffage). On distingue donc deux types d'incompatibilité au greffage :

- l'incompatibilité immédiate
- et l'incompatibilité différée qui se développe plusieurs mois ou années après l'assemblage.

Les incompatibilités tardives ou différées sont connues depuis longtemps et des observations ont montrées qu'elles survenaient aussi dans les vignes montrant des symptômes de bois strié. Actuellement, l'incompatibilité au greffage représente une véritable maladie émergente.

i – Virus en cause

Une très forte corrélation a été démontrée entre la présence du syndrome d'incompatibilité sur Kobber 5 BB et celle d'une souche ordinaire du GLRaV-2.

Le GLRaV-2 associé au GVB sont impliqués dans le développement de jeunes vignes greffées en Californie.

Le GLRaV-2 a été détecté dans des vignes malades au Chili.

Un autre virus responsable d'incompatibilité au greffage appelé Grapevine rootstock stem lesion-associated virus (GRSLaV) détecté à l'origine en Californie paraît en fait être un variant du GLRaV-2. D'autres variants du GLRaV-2 ont été décrits en Nouvelle-zélande, Chili et Australie en association avec le dépérissement de jeunes vignes.

En Australie également, une souche du virus de la marbrure (GFkV) a également été incriminée dans ce syndrome.

(MARTELLI G.-P., 1993 ; extended abstracts of 14th ICVG conference ; extended abstracts of the 15th ICVG conference ; Australian government, 2004 ; HABILI N. et MONIS J., 2006 ; JOHNSON R.-C., 2003 ; NICHOLAS P., 2006 (a) et (b)).

ii – Transmission

Le GLRaV-2, un membre des *Closterovirus* n'est pas transmis par des cochenilles comme la plupart des virus du genre, et n'a pas de vecteur naturel connu. Sa dissémination a lieu avec le matériel de propagation. Le GVB est transmis par des cochenilles et peut être disséminé par ces insectes au champ.

iii – Symptômes

Dans le cas d'incompatibilités différées, généralement la longueur des pousses est très réduite, les feuilles rougissent ou jaunissent et le greffon dépérit (cf photo).



Photo 12 : Incompatibilité au greffage avec rougissement des feuilles et pousses très réduites. Certains assemblages ont disparus totalement. (Photo MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006)

A côté de ces maladies d'importance capitale pour l'agriculture viticole, de très nombreuses autres viroses ont été aujourd'hui décrites et caractérisées sur vigne. Nous allons citer les principales dans le paragraphe suivant. La présentation rapide des symptômes de ces atteintes nous permettra d'une part de mieux comprendre la suite concernant la description des symptômes du court-noué, et, d'autre part, d'avoir une vue d'ensemble sur les maladies à virus de la vigne qui parfois possèdent des agents étiologiques communs, ou qui sont le résultat de l'infection croisée par plusieurs virus et/ou viroïde en associati

2 - Les maladies virales mineures infectant la vigne

Il s'agit de maladies transmissibles par greffage auxquelles une étiologie virale à été clairement établie. Certaines ont été mise en évidence uniquement en Europe alors que d'autres se développent au Japon. Leur importance économique est mineure au plan mondial par rapport aux affections citées ci-dessus, mais elle peut être de taille localement, pour une région précise.

a – Les maladies européennes.

Elles portent toutes des noms anglais et il n'existe pas de synonymes en français.

- Grapevine yellow mottle. Syndrôme relié à l'alfalfa mosaic virus (AMV) qui a été rapporté en Allemagne, Suisse, Hongrie, ex Tchécoslovaquie, Bulgarie et Turquie. L'affection est caractérisée par différents types de jaunissements (Photo 13 et 14). La vigueur de la plante ainsi que la récolte ne paraissent pas significativement diminuées.



Photo 13 : Mosaïque jaune induite par l'AMV au printemps. (Source : MARTELLI G.-P.)



Photo 14 : Taches jaunes et lignes chlorotiques sur cv. Chardonnay en été. (Source : MARTELLI G.-P.)

- Grapevine line pattern. Le virus probablement à l'origine de ce syndrome est le Grapevine line pattern virus (GLPV). Les feuilles montrent des décolorations jaunes pâles, des points ou des taches formant des lignes ou des anneaux sur les feuilles (Photo 15 et 16). La vigueur et la productivité des plantes sont réduites. Cette maladie n'a été mise en évidence que dans les vignobles hongrois.



Photo 15 : lignes chlorotiques sur un rameau nouvellement infecté (cv. Jubileum 75). (Source : MARTELLI G.-P.)

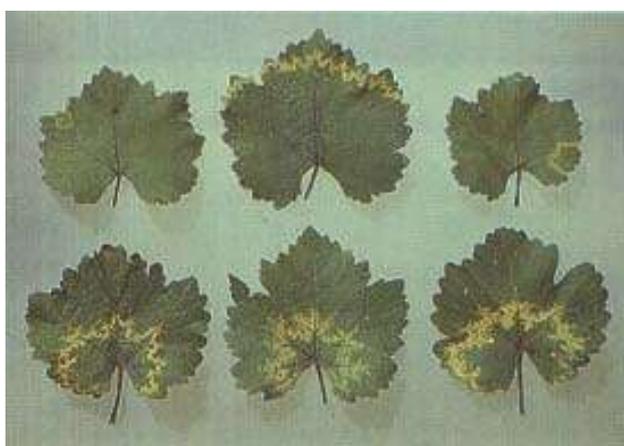


Photo 16 : Anneaux et lignes chlorotiques typiques associés au Line pattern disease. (Source : MARTELLI G.-P.)

- Rotidis leaf discoloration. Les vignes développant les symptômes typiques de cette maladie ont montré une double infection par le GFLV (virus du court-noué) et le Carnation mottle virus (CarMV). D'après le dernier rapport bibliographique du CIHEAM, il semblerait que le GFLV ne soit plus incriminé comme agent étiologique dans ce syndrome. Par contre, la présence du Grapevine virus B (GVB) est fortement corrélée à l'existence de ces symptômes sur les vignes touchées. Cette virose touche uniquement la Grèce (Extended abstracts 15th Meeting ICVG, 2006).



Photo 17 : Décolorations sectorielles et jaunissement des nervures associé au rougissement des bords du limbe sur cv. Roditis. (Source : MARTELLI G.-P.)

- Grapevine angular mosaic. Le Grapevine angular mosaic virus est rattaché à cette affection. Ce virus serait transmis par le matériel de propagation mais aussi par le pollen. Les symptômes prennent l'aspect de ponctuations chlorotiques anguleuses sur la surface des feuilles, décolorations des tissus bordant les nervures, déformations et froissement des feuilles. Les fleurs avortent entraînant une coulure. Les grappes sont incomplètes et constituées de petites baies à graines stériles. Ce syndrome est rapporté dans les vignobles grecs.
- Yellow line pattern. Le Raspberry bushy dwarf virus (RBDV) a été isolé des vignes symptomatiques. Le mode de dissémination naturelle chez la vigne est inconnu, mais pour le framboisier il infecte la graine et le pollen par lesquels il se transmet. Les vignes plantées avec le cultivar Laski Rizling développent un syndrome de Yellow line pattern qui peut être comparé au Grapevine line pattern décrit en Hongrie.

b – Les maladies japonaises

- Grapevine berry inner necrosis. L'agent étiologique est le Grapevine berry inner necrosis virus, genre *Trichovirus*. Il est transmissible mécaniquement. La transmission naturelle de ce virus est assurée par un insecte (*Colomerus vitis*). Ce mode de dissémination naturel provoque la contamination des jeunes vignes replantées en un an environ. Les vignes infectées présentent une diminution de la vigueur ainsi que des anomalies chromatiques de type mosaïques, anneaux et lignes chlorotiques. La récolte est également affectée avec des baies petites, décolorées à l'extérieur et souvent nécrosées à l'intérieur. Cette maladie n'a été décrite qu'au Japon.
- Grapevine stunt. Le virus responsable n'est pas bien connu et ne porte pas de nom. Un virus limité au phloème et non transmissible mécaniquement est associé à cette maladie et paraît à ce jour en être l'agent étiologique. La dissémination naturelle est assurée par une cicadelle. Les symptômes ne sont visibles qu'au printemps. La végétation est retardée, les entre-nœuds sont courts, les feuilles plus petites, plissées et parfois leur marge est nécrosée. Les inflorescences sont également plus petites et peu nombreuses. L'été, la végétation paraît normale puisque les symptômes disparaissent avec la chaleur. Ce syndrome n'a été décrit qu'au Japon.

3 - Les infections « virus-like ».

a – La mosaïque des nervures (vein mosaic)

Cette maladie est également à considérer car elle touche de nombreuses variétés anciennes de *Vitis vinifera*. L'agent étiologique n'est pas identifié jusque là mais on suppose cependant qu'il pourrait s'agir d'un organisme de type mycoplasme. Cette hypothèse n'a pour l'instant pas été confirmée. Ce syndrome se manifeste par des symptômes de mosaïque foliaire aussi bien chez les variétés de porte-greffe que chez les *Vitis vinifera*. Une mosaïque vert pâle affecte les tissus proches des nervures primaires et secondaires (Photo 18). Il est intéressant de noter que le court-noué peut parfois provoquer des mosaïques vertes ou jaunes très comparables à la mosaïque des nervures (cf photo).



Photo 18 : Intense décolorations autour des nervures typiques de la mosaïque des nervures. (Source : MARTELLI G.-P.)

b – La nécrose des nervures (vein necrosis)

Cette maladie est largement répandue et est probablement présente dans le monde entier. Elle infecte de nombreux cépages à l'état latent. Elle se manifeste surtout sur le porte-greffe *V. rupestris* X *V. berlandieri* 110 Richter. La croissance est fortement réduite et des nécroses noirâtres apparaissent sur les nervures des feuilles (Photo 19). L'agent de la nécrose des nervures est inconnu mais l'on suspecte fortement un virus, peut-être le GRSPaV. Des hypothèses portent aussi sur un mycoplasme présent dans le phloème de vignes symptomatiques, mais aucune relation entre la présence de ce parasite et la maladie n'a été prouvée.



Photo 19 : Vein necrosis ou nécrose des nervures. (Source : Caudwell A. INRA Dijon)

c – La maladie des énaitions (enation disease)

C'est l'une des plus vieilles atteintes connues sur les vignes européennes. Elle a été décrite dans des manuels avant 1800. L'étiologie de la maladie des énaitions n'est toujours pas claire. Sa transmission par greffage suggère que c'est une maladie virale, et la présence fréquente du GFLV dans les vignes atteintes soutient l'hypothèse que la maladie des énaitions pourrait être due à une souche très virulente du GFLV (hypothèse non confirmée). Les énaitions sont des excroissances tissulaires de quelques millimètres qui se développent sur les faces inférieures des feuilles, généralement à la base des sarments. Les feuilles sont souvent déformées avec des découpures anormales ; leur limbe est épaissi et les veines sont protubérantes (Photo 20). Le débourrement est retardé et le développement des sarments est ralenti donnant au cep un aspect buissonnant. La quantité et la qualité de la récolte sont affectées. Des symptômes d'énaitions ont été observés sur de nombreux cépages de *V. vinifera* en Californie et en Europe, y compris en France (WALTER B. *et al.*, 2000). Les cépages Grenache, Italia, Panse précoce, Primus, Riesling, Tokay sont sensibles et la meilleur indicateur infecté par greffage semble être LN 33.



Photo 20 : Enations sur feuilles de la base d'un rameau. (Source FAO/IBPGR, 2008)

d – Summer mottle.

C'est une maladie touchant les vignobles australiens qui ressemble à la mosaïque des nervures européenne et au Greek roditis leaf discolouration. Une hypothèse avance que Summer mottle et Greek roditis leaf discolouration pourraient être la même maladie.

4 – Maladies viroïdales

On peut définir succinctement les viroïdes comme étant des acides nucléiques (ARN) dotés d'une capacité de réplication autonome dans leurs hôtes. Ces acides nucléiques sont de taille très inférieure au plus petit des virus connu. Cinq viroïdes sont actuellement connus pour infectés la vigne : Grapevine yellow speckle viroid 1 (GYSVd-1), Grapevine yellow speckle viroid 2 (GYSVd-2), Australian grapevine viroid (AGVd), Hop stunt viroid grapevine strain (HSVd-g), Citrus exocortis viroid grapevine strain (CEVd-g). Seuls GYSVd-1 et GYSVd-2 sont pathogènes, induisant un syndrome appelé yellow speckle ou moucheture jaune en français. Les symptômes décrits diffèrent avec les cépages mais il s'agit dans tous les cas de points jaunes apparaissant sur toute la surface de la feuille ou d'un jaunissement le long des nervures (Photo 21). Ces atteintes apparaissent au milieu de l'été et perdurent le reste de la saison végétative. Beaucoup de vignes infectées restent asymptomatique. Un symptôme typique correspondant à un jaunissement le long des nervures principales s'étendant ensuite aux espaces internervaires est appelé la panachure réticulée ou vein banding. Cette panachure réticulée peut être provoquée par une infection par des viroïdes GYSVd, mais est le plus

souvent causée par une co-infection avec le GFLV (cf symptômes du court-noué dans la deuxième partie).



Photo 21 : Symptômes typiques de moucheture (Source : FAO/IBPGR, 2008)

II- LE COURT-
NOUE : LA
MALADIE ,
CONNAISSANCES
ACTUELLES EN
BIOLOGIE

Le court-noué est l'une des maladies virales infectant la vigne les plus sévères dans le monde. C'est aussi la plus ancienne maladie connue de la vigne. La plupart des auteurs la présente même comme la virose la plus importante tant au niveau de sa présence sur le globe que de son incidence sur l'économie de la filière viti-vinicole et sur l'état sanitaire des vignobles (RASKI *et al.*, 1983 ; BOVEY *et al.*, 1990 ; MARTELLI and SAVINO, 1990 ; WINTERHAGEN *et al.*, 2007 ; VIGNE E. *et al.*, 2004). Elle est décrite depuis plus de 200 ans en Europe sur les portes-greffes hybrides, et des spécimens retrouvés dans des herbiers montrent qu'elle est bien antérieure à l'introduction des portes-greffes américains (MARTELLI et SAVINO, 1988). Elle est la cause de pertes en termes de productivité mais elle affecte aussi la qualité des fruits et diminue la longévité des ceps dans les vignobles.

Les népovirus du court-noué infectent donc les porte-greffes et les cépages issus des *Vitis* américains ou de *Vitis vinifera* et leurs hybrides. L'infection conduit à la mort du cep atteint soit de façon rapide (c'est surtout le cas pour les jeunes vignes) soit suite à un dépérissement lent sur plusieurs années (FATEMEH MAGHULY *et al.*, 2006). C'est ce dernier cas qui est le plus fréquent (WALTER B *et al.*, 2000). On estime en moyenne à 50% la diminution du temps de productivité d'un vignoble infecté par le GFLV passant de 30-40 ans à 15-20 ans (ANDRET-LINK *et al.*, 2004).

A - Symptômes et dégâts

D'une manière générale l'apparition des symptômes en phytopathologie ne correspond pas au début de la maladie. Il s'agit d'une étape d'extériorisation d'un processus entamé antérieurement. La maladie débute en réalité dès que la première cellule est infectée. Le temps qui s'écoule entre ces deux étapes est appelé temps d'incubation. Il est très important de tenir compte de cela notamment pour ce qui est du dépistage de la maladie qui doit parfois être envisagé avant l'apparition des symptômes.

Les techniques d'indexages biologiques qui consistent à la mise en évidence des symptômes sur des plantes indicatrices sont des étapes obligatoires du dépistage des viroses en viticulture dans le cadre de la sélection sanitaire. Nous voyons donc la grande importance de bien connaître la symptomatologie du court-noué, tant sur le terrain pour le viticulteur qui doit repérer les ceps atteints, que pour les producteurs de matériel certifié qui ne peuvent

shunter les étapes d'indexages obligatoires dans les schémas de certification comme nous le verrons plus loin. Cependant la simple observation ne peut en aucun cas suffir à identifier telle ou telle virose de la vigne car les symptomatologies peuvent être très semblables entre les viroses et les infections croisées sont très fréquentes (infections par plusieurs virus, ou souches du même virus, simultanément).

D'autre part, les symptômes peuvent rendre difficile l'identification clonale ou variétale et être à l'origine d'erreur (Vector of plant viruses, 2008). Une étude a démontré que seuls les clones exempts de virus et tout particulièrement exempt du GFLV, peuvent être correctement identifiés en se basant sur la morphologie des feuilles (MANNINI F., 2003).

Pour ce qui est des dégâts provoqués par le court-noué ils sont considérables. Les résultats qui montrent les effets souvent dramatiques des virus du court-noué sur la récolte de raisin sont très nombreux.

1 - Symptômes

Dans certains cas les symptômes ne se manifestent pas : il y a latence. Il convient de distinguer le cas du porteur de germes qui ne montre jamais de symptôme apparent, et celui du masquage ou les symptômes sont absents dans certaines conditions (température, nutrition, stade de développement, etc), mais apparaissent dans d'autres (LEPOIVRE P., 2003). Dans le cas de la virose du court-noué seul *Muscadinia rotundifolia* paraît immun.

a - Symptômes macroscopiques

La symptomatologie de la maladie du court-noué est très variée. De nombreux facteurs influent sur la nature et la sévérité des symptômes, en commençant par le cépage et l'espèce de porte-greffe. La nature de l'isolat viral est également prédominante. De nombreux autres facteurs comme le climat, la structure des sols, les méthodes culturales ont eux aussi une influence sur la symptomatologie. Pour illustrer la complexité et la diversité des symptômes nous pouvons citer un extrait du précis de viticulture de Galet (1977) qui écrit que le court-noué avait été « la maladie poubelle » puisque « toutes les affections d'origine inconnue étaient rassemblées sous ce nom générique et il a fallu de nombreuses observations pour trier tous les symptômes rassemblés ainsi et faire la part de ce qui revenait à la carence en bore,

aux gelées, à la chlorose, au rougeau, à la flavescence dorée, à l'influence de l'humidité, etc. de ce qui constituait les symptômes vrais des viroses ».

Les symptômes se manifestent sur les divers organes de la vigne infectée :

i - Sur les sarments

Raccourcissement et déformation des entre-nœuds, double nœuds, fasciation (La fasciation consiste en une morphogénèse anormale des tiges qui perdent leur symétrie radiale et s'applatissent en une bandelette symétrique par rapport à un plan). Les rameaux ont une croissance en zigzag.

ii - Sur les feuilles

- Réduction de la surface des feuilles et déformations : sinus pétiolaire (jonction entre le limbe et le pétiole) élargi et nervures primaires (ou principales) rapprochées donnant à la feuille l'aspect d'un éventail. Cette comparaison a donné son nom au virus responsable de la maladie, « fan » ayant pour sens « éventail » en anglais. Fanleaf signifie donc feuille en forme d'éventail (on trouve parfois dans la littérature l'expression de feuilles en palmettes). Le limbe est également atteint et devient asymétrique avec une exagération de la dentelure. Les dents deviennent plus aigues et plus profondes. On parle de dentelure acérée des feuilles.



Photo 22 - sinus pétiolaire élargi et dentelure acérée des feuilles. (Source MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006)

- La couleur des limbes est souvent modifiée. Ces anomalies sont de différents types dépendants beaucoup de la souche virale et du cépage. Elles ont pour origine un manque de chlorophylle dû aux altérations métaboliques entraînées par la virose. On regroupe ce type de modification de couleur sous le terme générique de chlorose ou hypochlorophyllose. Lorsque la chlorophylle est totalement absente, on obtient généralement une jaunisse due à la révélation de la couleur des carotènes et des xanthophylles (ce sont d'autres pigments). Les chloroses du court-noué présentent différents aspects : jaunissement total, panachure ou panachure réticulée, ou bien encore taches annulaires chlorotiques et mosaïques.
- Mosaïques : ce terme désigne en phytopathologie l'alternance de zones de coloration verte et de zones jaunes ou chlorotiques. Lorsque la séparation entre les zones de colorations différentes est mal définie, diffuse, on parle de marbrure du feuillage. Si, au contraire, les bords sont nettement définis il s'agit alors de panachures. Cependant en viticulture, la symptomatologie est souvent à l'origine de la dénomination des maladies et des virus impliqués. Ainsi la marbrure désigne une maladie virale et même un complexe regroupant plusieurs affections comme

nous l'avons vu dans la première partie. Donc lorsque les auteurs parlent de mosaïque dans le cadre du court-noué, ils excluent les symptômes caractéristiques de la marbrure en tant que maladie. Le court-noué peut provoquer tous les types de mosaïques jaunes. On peut également trouver des mosaïques vertes avec alternance de zones vertes claires et vertes foncées qui semblent survenir dans le cadre de certaines coinfections (department of agriculture – gouvernement of western austria, 2006). Nous avons vu que ces mosaïques vertes peuvent être confondues avec des symptômes de la mosaïque des nervures (cf 1^{ère} partie).

- Jaunissement total : Dans le cas d'une infection par le court-noué le jaunissement total de la plante correspond à une couleur que l'on qualifie de jaune chrome. Cette couleur est assez spécifique de la virose.
- Taches annulaires chlorotiques : ces taches sont des jaunissements du limbe à bordures bien délimitées de forme arrondie.
- Panachure réticulée : il s'agit d'un jaunissement des nervures primaires et secondaires donnant l'aspect d'un quadrillage sur la feuille.

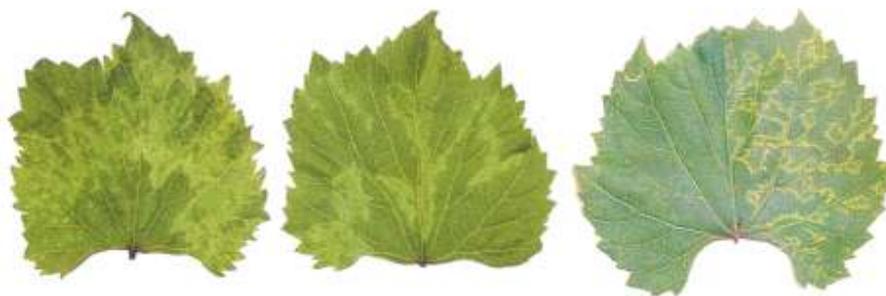


Photo 23 - exemples de mosaïques vertes (deux feuilles de droite) et taches ou lignes chlorotiques (feuille de droite). L'élargissement du sinus pétiolaire est remarquable. (Source MARTELLI G.-P.)

iii - Sur les grappes

Réduction du nombre et de la taille des grappes, coulure et millerandage, retard à la maturation. Le stade ultime du syndrome peut être un déperissement généralisé. La coulure

est une altération ou une élimination du pollen due à des éléments climatiques (froid, pluie) ou pathologiques résultant en une altération de la fécondation et de la fructification. Le terme de millerandage caractérise un développement imparfait des grains de raisin, par suite d'une mauvaise fécondation.

iv - Sur les racines

Les racines des plantes infectées sont moins développées que celles des plantes non infectées. Les racines sont également abîmées par les piqûres des nématodes qui transmettent le virus. Il se forme sur les racines des nodules qui ont l'aspect de galles. Même si cette atteinte a des conséquences bien moindres sur la physiologie de la plante que celles dues au virus lui-même, elle n'est sans doute pas tout à fait négligeable dans les cas où les piqûres sont multiples. Les racines sont alors très déformées. Cependant cette hypothèse n'est pas admise par tout le monde. ESMENJAUD et WALTER qui sont deux des très grands spécialistes français sur le court-noué ont publié un article (ESMENJAUD D. *et al.*, 1992) dans lequel ils étudient la distribution verticale de *X.index*. D'après leur étude, un effet direct du vecteur sur les capacités fonctionnelles des racines est exclu. Mais ce travail a été réalisé en Champagne uniquement et ne peut donc pas permettre de conclusion quant à l'ensemble des vignobles bien que les densités de population du vecteur soient assez importantes dans cette région.

La liste des symptômes dont il est fait état ci-dessus est tirée de la compilation des articles et ouvrages utilisés pour la rédaction de ce mémoire.

b - Répartition des symptômes en deux grands syndrômes.

GP Martelli, professeur de phytopathologie, spécialiste des viroses de plantes à l'université de Bari en Italie, est très certainement l'un des scientifiques ayant le plus publié sur le court-noué. Il compte à son actif plus de 600 articles publiés et de nombreux ouvrages. Dans l'un de ses livres (graft-transmissible diseases of grapevine - handbook for detection and diagnosis) rédigé avec une autre grande spécialiste, Elisabeth BOUDON-PADIEU, nous pouvons trouver une intéressante description de la maladie.

Martelli classe tous les symptômes du court-noué décrit ci-dessus en deux grands syndrômes distincts résultant d'une réaction différente de la vigne à des souches

biologiquement différentes du virus en cause, le GFLV. Cette description est la plus fréquemment retrouvée dans la littérature et fait office de référence. Nous remarquerons que selon lui il n'y a qu'un virus responsable de ce qui est défini en anglais comme « grapevine degeneration-fanleaf ». Effectivement comme nous l'avons vu en première partie le terme de court-noué n'a pas de traduction internationale et correspond plus à ce que l'on observe dans les vignobles français où seuls deux nepovirus sont retrouvés, le GFLV et l'ArMV. Le court-noué est en fait le syndrome de dégénérescence infectieuse retrouvé sur le territoire viticole français. Cependant il décrit les symptômes produits par l'ArMV dans un groupe de pathologie appelé par les scientifiques « dégénérescence infectieuse provoquée par les népovirus européens » (infectious degeneration – european *Nepovirus*). En général, ceux-ci ne sont pas différenciables de ceux provoqués par le GFLV (HYPP pathologie. INRA, 2008 ; Les fiches pratiques de l'ITV, 2008). En effet, pour l'ArMV nous notons également l'existence de deux types de souches provoquant deux grands syndromes identiques. Tout ceci se justifie par la proximité des deux virus d'un point de vue phylogénétique, comme nous l'aborderons brièvement plus loin dans la description des virus. Nous superposeront donc dans ce chapitre des illustrations avec des symptômes provoqués par le GFLV et l'ArMV qui constituent le complexe viral du court-noué.

i - Le syndrome de déformation infectieuse

Il est dû aux souches déformantes des virus du complexe. Ces souches virales peuvent provoquer un retard de croissance de la vigne et les plants ont un aspect rabougri. Les feuilles présentent des déformations sévères et d'aspect assez variable en fonction du cépage. On observe une perte de la symétrie des feuilles qui se plissent et prennent plus ou moins une forme de coupe (photo 24 et 25). On remarque sur la photo 25 un sinus pétiolaire très élargi.

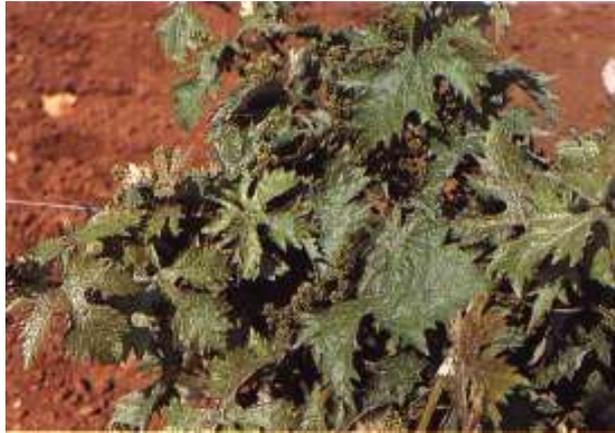


Photo 24 - déformation sévère des feuilles et rabougrissement de la végétation sur vigne infectée par une souche déformante du GFLV (Source MARTELLI G.-P.)



Photo 25 - feuille de vigne avec symptômes typiques du court-noué (Source MARTELLI G.-P.)

Dans ce syndrome, des taches chlorotiques peuvent parfois accompagner les symptômes foliaires (photos 26 à 29). Sur les illustrations présentées ci-dessous les signes peuvent paraître différents mais ceci n'est pas surtout dû à la nature des virus infectants mais plutôt aux cépages qui ne sont pas les mêmes. Nous retrouvons cependant, même si l'aspect des feuilles n'est pas identique, des symptômes du même type avec une exacerbation de la dentelure des feuilles, un sinus pétiolaire élargi et des taches chlorotiques.



Photo 26 - Taches chlorotiques et déformations provoquées par une souche déformante du GFLV. (Source MARTELLI G.-P.)



Photo 27 - Tâches et déformations provoquées par une souche déformante de l'ArMV. (Source MARTELLI G.-P.)



Photo 28 – mosaïque jaune (taches) et déformation des feuilles induites par une souche déformante d'un népovirus européen. (Source MARTELLI G.-P.)



Photo 29 – Panachure réticulée provoquée par le GFLV. (Source : Fiches pratiques de l’ITV, 2005)

Les tiges sont également déformées. On retrouve des anomalies de la ramification avec des noeuds doubles, des entre-noeuds courts ou de longueurs inconstantes, des fasciations et une croissance en zigzag (photo 30 à 32). Ces symptômes donnent au rameau une allure dite en “balai de sorcière” qui est caractéristique également d'une maladie cryptogamique de la vigne, l'eutypiose. La confusion est très facile à faire si l'on se base sur la seule allure des rameaux mais nous détaillerons les confusions possibles plus loin.



Photo 30 : fasciation sur rameau + présence d’un double nœud. (Source : SRPV midi-pyrénées, 2005)



Photo 31 - Ramification anormale d'un rameau sur vigne infectée. (Source : HYPP pathologie. INRA, 2008)



Photo 32 - croissance anormale sur vigne infectée. (Source : SRPV midi-pyrénées, 2005)

Les grappes sont petites et moins nombreuses. Les symptômes de coulure ou millerandage peuvent être marqués. Les baies, même celles qui sont bien retenues, ont une taille inférieure à la normale (photo 33 et 34).



Photo 33 – comparaison de grappes issuent d'un cep sain et d'un cep court-noué. (Source MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006)

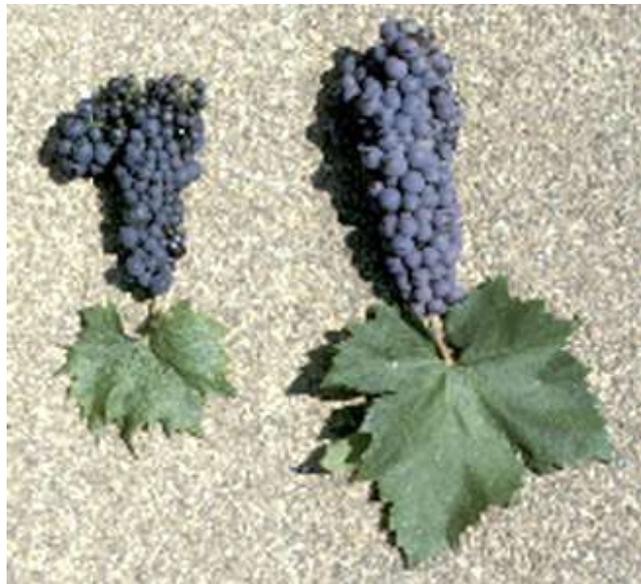


Photo 34 - A gauche vigne infectée par une souche déformante du GFLV. On remarque l'égargissement très net du sinus pétiolaire. (Source MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006)

Les symptômes foliaires se développent tôt, dès le début du printemps (SRPV midi-pyrénées, 2005 ; Les fiches pratiques de l'IFV, 2008). Ils persistent pendant toute la période végétative. Cependant une diminution de l'intensité de ces symptômes peut avoir lieu en cas de très forte chaleur. Ceci a été rapporté surtout pour les vignobles du pourtour méditerranéen et les vignobles australiens où les étés peuvent être particulièrement chauds.

ii - Le syndrome de la mosaïque jaune

La mosaïque jaune est due aux souches chromogènes des virus. Les vignes infectées montrent des décolorations jaune-chrome qui se développent très tôt dans la saison végétative, dès les premiers stades. Ces symptômes peuvent toucher tous les organes de la plante à savoir les feuilles, les jeunes rameaux non lignifiés, les vrilles et les inflorescences (photo 35 et 36).



Photo 35 - jaunissement total de rameaux printaniers d'une vigne infectée par une souche chromogène du GFLV. (Source MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006)



Photo 36 – jaunissement progressif des feuilles d'un rameau. Couleur jaune-chrome caractéristique. (Source : Fiches pratiques de l'IFV, 2008)

Dans ce syndrome les altérations chromatiques des feuilles varient. Elles se caractérisent en général par de nombreuses petites taches chlorotiques dispersées. Parfois ces taches apparaissent sous forme d'anneaux ou de lignes pouvant aller jusqu'à une mosaïque très étendue des nervures ou des espaces internervaires (on parle souvent dans ce cas de panachure des feuilles). A l'extrême un jaunissement total de la feuille peut survenir ("chrome mosaic") appelé alors panachure totale (photos 37 à 43).



Photo 37 : anneaux chlorotiques. (Source : fiches pratiques de l'ITV, 2005).



Photo 38 : symptômes de mosaïque jaune sur indicateur Kobber 5BB. (Source : MARTELLI G.-P.)



Photo 39 : symptômes de panachure sur feuille. (Source : SRPV midi-pyrénées, 2005)



Photo 40 : cep typique du syndrome en bordure d'un foyer de court-noué (tests ELISA positifs pour le GFLV) On peut remarquer que d'autres ceps sont morts au niveau de ce foyer. (Source : MARTELLI G.-P.)



Photo 41 – Jaunissement total de cep au sein d'un foyer de court-noué. (Source : MARTELLI G.-P.)



Photo 42 – couleur chrome caractéristique des atteintes chromatiques dues au court-noué. (Source : Fiches pratiques de l'IFV, 2008).

Au printemps, les plants infectés d'un vignoble sont très facilement repérables même à distance. Ceci peut permettre à cette saison de faire un bilan épidémiologique visuel du vignoble. Cependant on ne repère de cette façon que les plants atteints par les souches chromogènes ou par des souches déformantes présentant des altérations chromatiques ou des réductions de vigueur suffisamment importantes (Photo 43 A). Les malformations des feuilles et des tiges ne sont que peu ou pas visibles dans ce syndrome. Cependant les grappes peuvent être plus petites avec des baies de taille réduite (Photo 43 B).

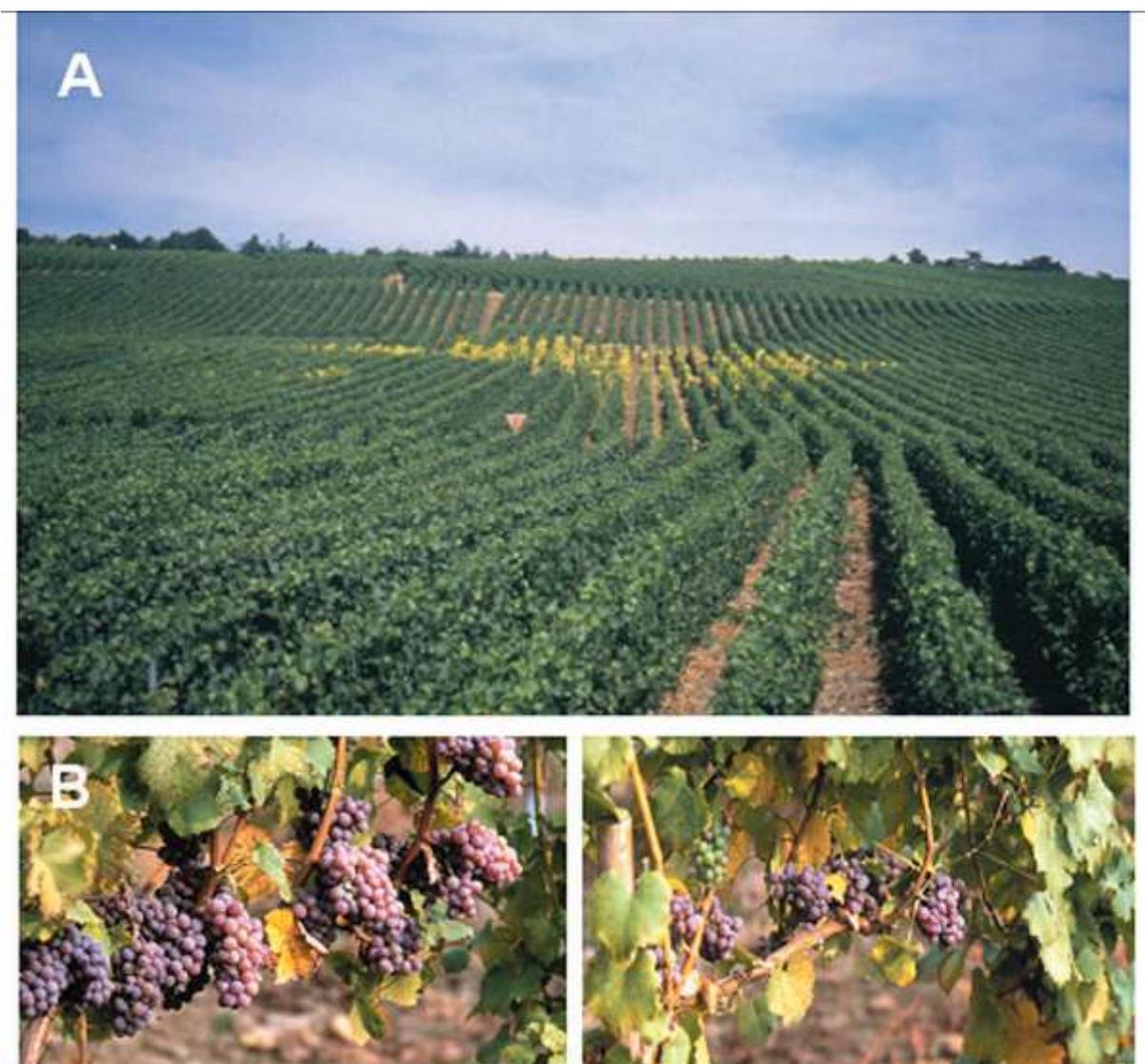


Photo 43 – A : foyer de court-noué présentant des altérations chromatiques / B : réduction de la taille et du nombre des grappes en présence d'un syndrome de mosaïque jaune. Ce symptôme n'est pas systématique comme le montre la différence de récolte entre la photo de droite et de gauche. (Source : ANDRET-LINK P., 2005)

Sous les climats chauds, les nouvelles pousses de l'été (mois d'août) présentent une couleur verte normale tandis que la couleur jaune des anciennes pousses tourne au blanchâtre et a tendance à s'atténuer (Photo 44).



Photo 44 – Atténuation des altérations chromatiques virant au blanchâtre. (Source : MARTELLI G.-P.)

Comme nous l'avons dit en début de chapitre, les conditions climatiques (et bien d'autres facteurs) influent beaucoup sur la nature et l'intensité des symptômes. De ce fait, il est très important de noter que les symptômes provoqués par les souches déformantes ne diffèrent pas entre les conditions en champs et les conditions sous serres. Ceci n'est pas le cas pour les souches chromogènes provoquant la mosaïque jaune (ou panachure). On note parfois l'absence de développement de ce syndrome dans les serres des pépinières viticoles.

En début de ce chapitre nous avons cité parmi les altérations chromatiques dues au court-noué des panachures réticulées. La panachure réticulée est en fait un troisième syndrome à part entière. Il est caractérisé par un jaunissement le long des nervures principales et des zones internervaires associées. Les signes apparaissent du milieu à la fin de l'été. Il n'est pas noté de malformation des feuilles, mais la productivité de la vigne est faible (MARTELLI GP. and SAVINO, 1988). Il est parfois difficile de différencier ce syndrome de certaines mosaïques des nervures décrites plus haut dans le "yellow mosaic syndrom". Il y a encore très peu de temps les connaissances scientifiques ne permettaient pas d'en définir clairement l'agent étiologique. Pour beaucoup d'auteurs la panachure réticulée est encore citée dans la liste des symptômes du court-noué (Les fiches pratiques de l'itv, fiches SRPV). Ceci n'exclut pas l'hypothèse qu'un autre agent soit à l'origine de ce syndrome, et qu'il puisse intervenir dans le cadre d'infections croisées avec le GFLV ou l'ArMV. Citons pour exemple un extrait d'un article de LAGHA M. du Centre International de Hautes Etudes Méditerranéenne (CIHEAM) situé à Bary en Italie, appartenant à l'Institut Agronomique Méditerranéen. Elle

écrit : “une caractérisation biologique électrophorétique et sérologique de 3 isolats du virus du court-noué de la vigne (GFLV) a été réalisée. Ces isolats sont originaires de 3 cepes présentant respectivement les symptômes de malformation et déformation (*fanleaf*), panachure (*yellow mosaic*), et de panachure réticulée (*vein banding*).” La conclusion de l'article est qu'il a été impossible de différencier ces isolats entre eux. On ne peut donc conclure qu'un type de souche du GFLV provoque la panachure réticulée (LAGHA M., 1992).

GP. MARTELLI écrit dans “handbook for detection and diagnosis” : “*la panachure réticulée, (...) un syndrome traditionnellement supposé être du aux souches chromogènes du GFLV, pourrait avoir une étiologie différente, peut-être viroïdale (...)*” (MARTELLI GP., 1993). Ces nouvelles considérations datent à peu près des 15 dernières années. MARTELLI et SAVINO, par exemple, décrivait dans un article daté de 1988, 3 grands syndromes pour la maladie du court-noué de la vigne : malformations (*fanleaf*), mosaïque jaune ou panachure (*yellow mosaic*) et panachure réticulée (*vein banding*) sans faire état d'une quelconque autre étiologie possible pour le *vein banding disease* (MARTELLI and SAVINO, 1988).

Plus récemment, un article publié par une institution gouvernementale australienne au sujet de l'état sanitaire et de la sélection sanitaire en Australie fait état de coinfections GFLV/GYSVd (Grapevine Yellow Speckle Viroids 1 et 2) dans lesquelles les GYSVd 1 et 2 sont des particules viroïdales (cf partie I). Il est décrit que dans le cadre de ces coinfections on observe souvent un syndrome de panachure réticulée. (Australian government, 2004).

Aujourd'hui il semble admis par le corps scientifique que l'étiologie du *vein banding disease* soit bien cette coinfection entre GFLV et GYSVd. Le dernier rapport bibliographique paru en 2006 dans *Option Méditerranéenne* et réalisé par BOVEY R. regroupe plusieurs articles sur le sujet. Une synthèse de ce rapport accompagnant sa publication a été réalisée par MARTELLI et BOUDON-PADIEU qui confirment ces nouvelles données épidémiologiques (MARTELLI G.P. et BOUDON-PADIEU E., 2006).

D'autre part, à côté des symptômes communément rencontrés RASKI et ses collègues ont aussi fait état de mouchetures et petits points jaunes atypiques sur certaines vignes atteintes par le court-noué aux Etats-Unis (RASKI et al, 1983).

Enfin, plus récemment, un viticulteur du Languedoc a signalé des signes inhabituels de court-noué sur certaines de ces parcelles plantées en Merlot dans le département de l'Aude. Il s'agit de jeunes vignes récemment mises en place. Il observe depuis quelques années, au cours du printemps, l'apparition de symptômes particuliers dans certains secteurs de ces parcelles. Initialement localisées en bord de parcelles, ces anomalies concernent aujourd'hui de façon plus ou moins diffuse de grandes étendues avec des secteurs où les anomalies sont plus intenses. Les symptômes concernent essentiellement la morphologie foliaire et l'architecture de la vigne. Des tests ELISA (description dans le chapitre diagnostic) dirigés contre le complexe du court-noué (GFLV et ArMV) ont été effectués sur des échantillons prélevés en septembre sur des entrecoeurs en croissance. Ils se sont révélés positifs. L'anomalie pourrait donc correspondre à une expression symptomatologique particulière du court-noué (BONNET A. *et al.*, 2000).

Quelle que soit la nature de l'atteinte, les ceps touchés se répartissent en zones concentriques caractéristiques dans le vignoble si le virus a été transmis de proche en proche par son vecteur naturel : le nématode *Xiphinema index* pour le GFLV ou *Xiphinema diversicaudatum* pour l'ArMV. On parle alors de foyer de court-noué. On peut également appeler ces zones virosées des taches ou spots au sein de la parcelle (photo 43 A, plus haut). Ce mode de contamination naturel n'est pas le seul. La contamination peut en effet se faire par l'introduction de plants infectés, auquel cas la distribution dans la parcelle peut montrer un aspect différent (cf épidémiologie).

c - Symptômes intracellulaires ou microscopiques

L'infection virale entraîne des désordres au niveau intracellulaire. Parmi ceux-ci des structures tubulaires sont très remarquables en microscopie (Department of agriculture ; Gouvernement of Western Austria, 2006). Elles ressemblent à des barreaux traversant la lumière des éléments vasculaires. Ces structures sont constituées d'un noyau protéique entouré d'une gaine de cellulose envahie de lignine, de subérine ou de cutine en fonction des tissus. Elles sont facilement visibles dans les rameaux lignifiés et les entre-noeuds basaux. Ce sont des symptômes internes d'infection très hautement caractéristiques (ANDRET-LINK P. *et al.*, 2004 (a)) qui sont donc de très bons indicateurs de la présence du GFLV (MARTELLI et SAVINO, 1990).

2 - Les confusions possibles

Les confusions peuvent être nombreuses. Tout d'abord il est très difficile de dicerner les symptômes provoqués par les autres népovirus responsables de dégénérescence infectieuse chez la vigne (népovirus Européens). En effet, les symptômes provoqués par ces virus sont similaires voir indifférentiables de ceux provoqués par le complexe du court-noué. Les autres virus de la dégénérescence ont eux aussi des souches déformantes et des souches chromogènes comme nous l'avons déjà évoqué.

En plus de ces confusions entre les différents syndrômes de la dégénérescence infectieuse, d'autres atteintes de la vigne peuvent être confondues avec le court-noué que nous allons détailler dans ce chapitre :

a - Carences

i - Carences en bore

La présence d'entre noeuds courts et de doubles nœuds ainsi qu'une panachure des feuilles peut être due à une carence en bore. Cette carence n'est pas rare dans les vignobles (RYSER J.-P. *et al.*, 2007) et constitue l'un des principaux risque de confusion avec le court-noué. Il est à noter que l'excès en bore provoque les mêmes symptômes que la carence. Cependant celui-ci est beaucoup plus rare et ne peut survenir qu'après une mauvaise fertilisation (excessive) des terrains. Le bore est un élément minéral mineur, c'est-à-dire prélevé en très petite quantité par la plante mais essentiel à son développement. Pour résumer, de façon très synthétique, le rôle majeur du bore dans la plante est la synthèse de base azotée. Une déficience se manifeste par un mauvais développement des tissus méristématiques qui provoque des symptômes qui se confondent avec ceux des dégénérescences infectieuses.

Certaines conditions peuvent provoquer des carences en bore :

- sols secs (sécheresse)
- sols pauvres en matière organique
- sols acides avec un pH de 3,5 à 4,5
- sols alcalins avec un pH supérieur à 7

- cultivars sensibles (ste-croix, Seyval et St Pépin seraient les plus sensibles à la carence en bore.)

Les sols les plus sensibles sont les sols calcaires (diminution de l'assimilabilité du bore pour un pH supérieur à 6,3-6,5) et/ou irrigués. Les pratiques culturales comme l'enherbement peuvent être défavorables également en raréfiant la solution du sol (l'herbe présente assèche le terrain).

Comment reconnaître visuellement la carence en bore ?

Elle se caractérise en premier par un ralentissement de la croissance des rameaux. Ils présentent des entre-noeuds courts. Puis, autour de la floraison et souvent un petit peu avant (observations personnelles), apparaît un brusque jaunissement des feuilles. Il est diffus et se caractérise par des zones claires, jaunâtres, aux contours imprécis dans les zones internervaires. Les feuilles atteintes se situent sur la partie médiane ou à l'extrémité des rameaux. Parfois des taches de couleur rouge vif peuvent apparaître (sur les cépages rouges) ce qui, dans ce cas, évite la confusion avec le court-noué. Les jeunes feuilles restent petites, épaisses et boursoufflées entre les nervures (photo 45). Les déformations des feuilles peuvent être très semblables à celles du court-noué (photo 46). Cependant, en général, la dentelure des feuilles tend à s'estomper et le bord à s'arrondir, à l'inverse des observations faites dans les syndrômes de malformation de la dégénérescence infectieuse (photo 47). Ce n'est cependant pas toujours le cas.

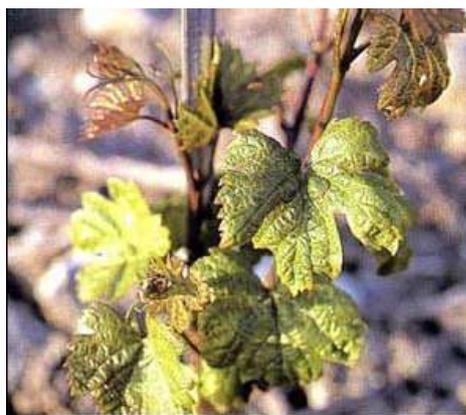


Photo 45 - Les feuilles carencées en bore sont boursoufflées entre les nervures. Les bords s'enroulent vers l'intérieur et la croissance est perturbée. (Cépage Doral). (source : RYSER *et al.*, 2007)



Photo 46 - Feuilles des extrémités et des entre-coeurs fortement déformées et restant petites. Raccourcissement important des entre-noeuds. (Cépage Gamay). (source : RYSER *et al.*, 2007)



Photo 47 - zones claires, jaunâtres aux contours imprécis entre les nervures. Le bord de la feuille devient arrondi, l'aspect dentelé disparaissant progressivement. (Cépage Sylvaner). (source : RYSER *et al.*, 2007)

Dans les cas graves, il apparaît des nécroses au centre des taches ou en périphérie du limbe. Sur les rameaux, l'arrêt de croissance des méristèmes terminaux engendre en plus du raccourcissement des entre noeuds, des ramifications, des fasciations, des doubles nœuds, donnant au rameau un aspect de « balai de sorcière » (photo 48).



Photo 48 - Cas grave avec apparition de nécroses sur les feuilles. Le développement des rameaux et des feuilles est fortement bloqué et déréglé. (Cépage Gamay). (source : RYSER *et al.*, 2007)

L'intervention directe du bore dans les processus enzymatiques de synthèse du saccharose et de l'amidon entraîne dans le cas de carence une perturbation du processus de floraison et de fécondation (coultre et millerandage). De nombreuses fleurs non fécondées se dessèchent. Si la déficience apparaît déjà sur les feuilles avant la floraison, la coultre peut être importante. Une mauvaise fécondation peut également engendrer le millerandage. Les baies, nouées, restent petites et prennent un aspect bosselé et une teinte plombée (Photo 49). Ces symptômes de coultre et de millerandage augmentent les risques de confusion (RAYNIER A., 1997) ; (Réseau d'avertissements phytosanitaires, 2007) ; (RYSER J.P. *et al.*, 2007).



Photo 49 - Coultre importante liée à une carence apparue avant la floraison. (source : RYSER *et al.*, 2007)

Pour s'assurer qu'il ne fait pas de confusion, le viticulteur peut demander un diagnostic de la carence en bore qui servira de diagnostic différentiel. Il se fait par une analyse de pétioles qui doit être envisagée vers le début du mois de septembre. Les résultats montrent une concentration de moins de 20 ppm lorsqu'il y a des signes de carence. (Réseau d'avertissements phytosanitaires, 2007)

ii - Carences en zinc

La carence en zinc peut également induire des déformations des feuilles très semblables à celles du court-noué et ressemblant à celles de la carence en bore. Des symptômes de coulure et de millerandage sont aussi observés. Par ailleurs, il faut noter que la carence en zinc se manifeste aussi par des symptômes de nécrose analogues à ceux de la nécrose des nervures d'origine virale dont l'agent n'est pas encore connu (cf première partie).

iii - Carences en fer

Elles peuvent ressembler à des symptômes de panachures caractéristiques des formes de court-noué provoquées par les souches chromogènes des deux népovirus.

Les carences en fer provoquent un jaunissement des feuilles. Seules les nervures restent vertes (photo 50 gauche). On observe des nécroses dans les cas graves (photo 31 droite). La vigueur des rameaux est réduite. Les manifestations de la chlorose s'observent sur les jeunes feuilles et l'extrémité des rameaux au début, puis envahissent l'ensemble des feuilles de la plante (photo 51). Les grappes sont petites, jaunes, coulées. Les cas graves peuvent aboutir au dépérissement du cep. Les symptômes apparaissent souvent de façon localisée dans la parcelle, ce qui rappelle également la dégénérescence infectieuse.



Photo 50 - A gauche : jaunissement de la feuille avec nervures vertes. A droite : cas grave avec nécrose. (source : Le guide viti d'agroscope, Changins Wädensvil)



Photo 51 : envahissement progressif de l'ensemble de la plante (source : Le guide viti d'agroscope, Changins Wädensvil)

iv - Carences en manganèse

Les carences en manganèse sont assez semblables aux carences ferriques à la différence que la décoloration internervaire débute avant véraison dans la partie médiane des rameaux (et non aux extrémités). Pendant de nombreuses années, l'utilisation de fongicides anti-mildiou de la famille des dithiocarbamates (à base de manèbe ou de mancozèbe) a limité la fréquence d'apparition de cette carence. Aujourd'hui, on observe une recrudescence des carences en manganèse suite à la diminution de ces intrants phytosanitaires (Centre d'agriculture de la Gironde, 2007).

v - Carences magnésiennes

Dans le cas de carence magnésienne grave, le jaunissement sur les cépages blancs (il s'agit d'un rougissement pour les cépages rouges) peut affecter l'ensemble du limbe et ressembler à ce moment à une carence ferrique ou au court-noué. Il reste cependant une petite bande verte autour des nervures principales qui fait de la carence magnésienne une affection qu'un œil averti ne doit pas confondre (Photo 52).



Photo 52 - Cas de grave carence magnésienne avec jaunissement quasi total du limbe (source : Le guide viti d'agroscope, Changins Wädensvil)

b - Atteintes par des ravageurs

i – Des acariens comme *Calepitrimerus vitis*

Calepitrimerus vitis est un acarien inféodé à la vigne. Il a un cycle de vie composé de deux stades : les femelles d'été et les femelles d'hiver. Les femelles d'hiver restent abritées sous les écailles des bourgeons dans la zone cotonneuse entre les méristèmes, ainsi que sous l'écorce des cepes et des rameaux, généralement près des noeuds. Au débourrement, ces femelles se nourrissent au détriment des tissus des bourgeons et y pondent. Elles y demeurent avec leur progéniture jusqu'à ce que la pousse aie entre 8 et 12 feuilles, puis elles migrent à la face inférieure des feuilles où elles vivent et pondent jusqu'à octobre-novembre. Une petite partie des effectifs migre vers les nouveaux jeunes bourgeons. Les femelles d'hiver, à partir d'août, remplacent les femelles d'été et constituent, à l'automne, toute la population de *C. vitis*. Les dégâts causés dépendent de la densité de population. On observe :

- des lésions nécrotiques à la face inférieure des écailles.
- un avortement peu après le débourrement, dû à la prise de nourriture de l'acarien

- un arrêt de développement des pousses, à 5 – 6 feuilles, suivi souvent de leur mort (lésions dans la partie basale) ; avortement des fleurs.

Ces symptômes ne sont pas caractéristiques du court-noué et doivent être recherchés sur la plante en plus des symptômes prêtant à confusion pour pouvoir établir un diagnostic. Les signes confusants de l'acariose avec le court-noué consistent en :

- une malformation des feuilles (photo 53). Celle-ci est souvent accompagnée d'un brunissement et d'un aspect rouillé du feuillage (provoqués par les ponctions des acariens).
- l'apparition de balais de sorcière, par suite du raccourcissement des entrenœuds et du développement de pousses supplémentaires après la mort du bourgeon principal (HYPPZ, 1997).



Photo 53 - acariose d'été sur jeune feuille de vigne due à *C. vitis* (source : HYPPZ, 1997)

ii - Des thrips

On peut rencontrer une dizaine d'espèces de thrips sur la vigne, mais une seule cause des dégâts importants : il s'agit de *Drepanothrips reuteris* que l'on appelle plus simplement thrips de la vigne. C'est un petit insecte de 0,6 à 0,86 mm de couleur jaune à brun-clair. Les dégâts qu'il cause s'observent dans les pépinières et les vignes, surtout en avril-mai lors du

débourrement. Les piqûres de nutrition et de ponte provoquent la décoloration des feuilles par plages et des perforations le long des nervures (SRPV midi-pyrénées, 2005). La plante prend un aspect buissonnant, les pousses sont rabougries et peuvent présenter des déformations (pousses en zigzag) rappelant fortement le court-noué (photo 54). La croissance générale est ralentie (LINDER Ch. et REMUND U., 2007). Sur grappes, les attaques de thrips entraînent la coulure et des baisses de rendement ce qui augmente les risques de confusions (Dow AgroSciences LCC, 2009).



Photo 54 - Dégâts sur pousse : mérithalles courts, développement en zigzag, zones striées, feuilles en cuillère. (source : BAILLOD M. (LINDER CH. et REMUND U. , 2007)

iii - Des cicadelles du genre *Empoasca*.

La plus répandue sur la vigne est *Empoasca vitis* encore appelée cicadelle verte ou cicadelle des grillures. Cet insecte est présent dans tous les vignobles. Il attaque dès le printemps en piquant la feuille pour se nourrir dans le phloème. Les dégâts sont visibles en juillet/août surtout lors de longues périodes de chaleur. Les feuilles de la partie inférieure du cep présentent des taches rouges (cépages rouges) ou des taches jaunes (cépages blancs) à angles aigus formant une mosaïque. Les confusions ne sont possibles que pour les cépages blancs puisque un rougissement des feuilles n'est pas caractéristique de court-noué. Le bord des feuilles atteintes se dessèche petit à petit (grillure) en fin d'été et s'enroule souvent (photo 55). A ce moment de la saison la confusion n'est plus possible.

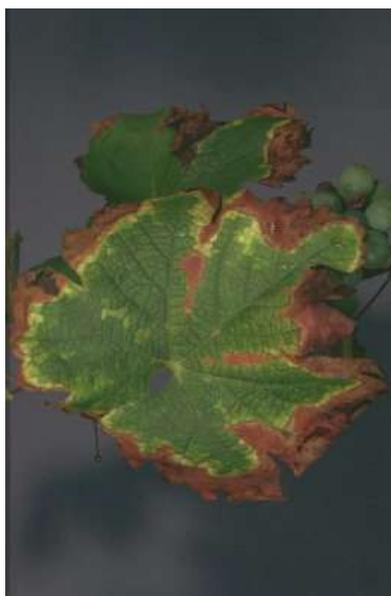


Photo 55 - symptômes de grillures avec nécrose du bord des feuilles. Cette nécrose doit permettre d'éliminer une suspicion de court-noué. (source : Photo INRA)

D'autre part, le diagnostic différentiel avec le court-noué est assez facile à faire en observant la face inférieure de la feuille. On y trouve des larves vert-clair à légèrement rougeâtre, des nymphes et des adultes vert-clair de 3 mm environ. Il est très facile de les reconnaître en observant leur déplacement en crabe. De nombreuses exuvies restent sur la face inférieure aidant également la reconnaissance (Photo 56).



Photo 56 - Larve vert-clair et exuvies d'*Empoasca vitis* sur face inférieure d'une feuille attaquée. Leur présence permet d'établir un diagnostic de façon certaine. (source : Photo INRA)

c - Atteinte par des phytoplasmes

Les phytoplasmes de la flavescence dorée ou du bois noir peuvent engendrer des symptômes de panachures caractéristiques de certaines formes de court-noué. On parle de jaunisses à phytoplasmes. Les symptômes sont communs à toutes les jaunisses de la vigne (WALTER B., 2000).

Les symptômes sont bien visibles en été, mais les vignes atteintes précocément peuvent être repérées dès le printemps à leur croissance réduite. Les symptômes sont présents sur un groupe de sarment par cep ou sur le cep tout entier. (SCHAERER S. *et al*, 2007).

La première conséquence visible sur la production, est un flétrissement des inflorescences ou un flétrissement des baies à partir de la rafle.

On constate parfois la nécrose du bourgeon apical de certains rameaux.

Les limbes des feuilles durcissent, se décolorent et présentent un enroulement plus ou moins accentué selon les cépages, allant jusqu'à conférer aux feuilles une forme triangulaire.

En contraste avec les symptômes de l'enroulement viral (cf première partie), les nervures jaunissent plus ou moins en fonction des cépages. Ce symptôme est notamment très accentué chez le chardonnay (Walter B., 2000).

Les décolorations des limbes sont les symptômes qui montrent le plus de variabilité selon les cépages, avec l'apparition de taches jaunes (cépages blancs) et rouges (cépages rouges). Ces taches sont très souvent sectorielles et bien délimitées pour les cépages rouges ce qui n'entraîne pas de confusion possible avec le court-noué. Sur certains cépages blancs (Sauvignon, Sémillon, Ugni blanc), les taches de décoloration sont plus diffuses et les enroulements des feuilles vers la face inférieure sont moins accentués. Les confusions deviennent alors faciles avec la dégénérescence infectieuse. Le jaunissement sur les cépages blancs des parties des feuilles exposées au soleil donne parfois un reflet métallique pouvant se confondre avec l'aspect chromé des feuilles présent dans certaines mosaïques jaunes ("chrome mosaïc") du court-noué. Plus tard dans la saison, des taches jaunes bien définies, de quelques millimètres de diamètre, apparaissent le long des nervures principales. Les spots s'élargissent et forment des bandes continues le long des veines pouvant rappeler certaines panachures caractéristiques (EPPO/CABI, 2006). Les colorations peuvent également suggérer le diagnostic de carences minérales (cf plus haut).

Dans tous les cas, il faut rechercher la présence de bois non aoûtés, qui doit permettre d'orienter le viticulteur vers une jaunisse (GUGERLI P., 2004). En effet, l'absence partielle

d'aoûtement est le symptôme le plus caractéristique (photo 57) et le plus frappant car les rameaux flexueux (minces et cahoutchouteux) retombent vers le sol et les souches non palissées ont un port pleureur accusé. Des punctuations brunes allignées sur l'écorce demeurée verte sont communes à toutes les jaunisses et sont souvent particulièrement nettes sur les jeunes boutures.



Photo 57 - Le cep de droite atteint de Flavescence dorée ne produit pas de raisin, les feuilles sont enroulées et l'on distingue clairement un sarment non aoûté (flèche de gauche). A gauche de ce cep, une plante saine, ainsi qu'en témoignent ses grappes. (Cépage Chasselas). (source : SCHAERER,2007)

d - Une maladie cryptogamique : l'eutypiose

C'est une maladie provoquée par un champignon ascomycète, *Eutypia lata*.

Les ceps atteints d'eutypiose présentent des symptômes de court-noué. Au printemps, les jeunes sarments développés à partir d'une corne infectée ont une croissance chétive, rabougrie (photo 58). Les entre-noeuds sont très courts. Les feuilles sont beaucoup plus petites que la normale, déformées ou déchiquetées et quelquefois chlorotiques (BOLAY A. et SIEGFRIED W., 2007). L'eutypiose se caractérise aussi par un dépérissement du cep. Ces manifestations ressemblent aux symptômes provoqués par des formes virulentes de court-noué (DUBOS B., 1999). L'eutypiose provoque également la coulure et le millerandage même si les grappes ont un aspect quasi normal jusqu'à la floraison.

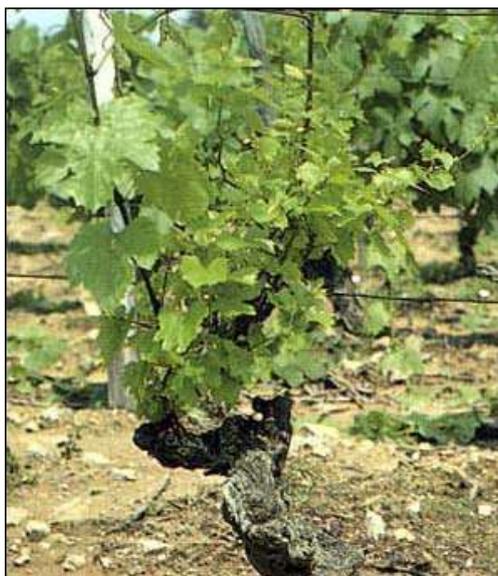


Photo 58 - Eutypiose sur un cep de Gamay. Le sarment de gauche est normal, les autres sont "court-noués". (BOLAY A., SIEGFRIED W., 2007)

e - autres causes à l'origine de confusions

- des *causes* génétiques. Certains ceps peuvent développer des panachures génétiques.
- coulure et millerandage sont des symptômes importants du court-noué, mais ils peuvent être développés par d'autres causes, climatiques et physiologiques.
- des déformations et panachures des feuilles, semblables aux symptômes du court-noué, sont fréquentes chez les plants issus de semis.
- le gel peut provoquer des panachures caractéristiques de certaines formes de court-noué.
- l'utilisation d'herbicide peut entraîner l'apparition de symptômes prêtant à confusion :
 - ✓ des hormones utilisées comme herbicides sélectifs produisent des déformations des feuilles rappelant celles de la virose.
 - ✓ Des herbicides antigerminatifs (monuron, diuron) peuvent entraîner l'apparition d'une panachure des feuilles.
- les symptômes de marbrure (cf première partie) sont souvent confondus avec ceux du court-noué lors des indexages sur *Vitis rupestris*.

Enfin, en dehors de toute atteinte, il faut noter que la présence relativement fréquente d'entre-nœuds courts et de double nœuds est un caractère génétique de quelques espèces comme l'Ugni blanc, le Riesling, le Pinot.

3 - Dommages et dégâts

Aux vues des symptômes de la maladie, on imagine aisément que les dégâts causés sont importants. Lors de la journée thématique sur l'«alternative à la lutte chimique contre le court-noué de la vigne» organisée par l'institut Rhodanien, l'INRA, l'ENTAV et ITV France à Avignon, il a été estimé que les viroses de la vigne coûtent à la viticulture française environ 380 millions d'euros par an (DEMANGEAT *et al.*, 2005 (c)). Ce chiffre permet d'imaginer l'impact économique de telles viroses au niveau de l'industrie viticole mondiale.

Les dégâts sont de différentes natures. Il s'agit de pertes de productivité associées à une diminution de la qualité des raisins produits. Le court-noué engendre aussi des problèmes de replantation liés à la contamination rapide des replants. Le GFLV a un effet négatif sur la quantité de bois récolté. De plus on relève de fortes diminutions de la reprise au greffage et un pourcentage de réussite du bouturage des espèces de porte-greffe très abaissé.

Il faut souligner tout d'abord pour bien prendre conscience de l'ampleur des dégâts provoqués par le court-noué que cette maladie virale est incurable au champ. C'est d'ailleurs le cas de toutes les viroses des plantes : une plante infectée par un virus le restera durant la totalité de son cycle de développement. Elle ne dispose pas, à l'inverse des animaux et de l'homme, de système immunitaire capable d'éliminer le virus. De plus, comme nous le verrons plus loin, on ne dispose pas de moyen de lutte chimique contre ces infections. Tout produit qui entrave le cycle du virus au sein de la plante interfère également avec le métabolisme de celle-ci et présente un caractère de phytotoxicité.

Il est très difficile d'obtenir une interprétation rigoureuse des résultats chiffrant les dégâts étant donnée la fréquence importante des infections croisées. Beaucoup des études envisagées se sont heurtées à ce problème puisqu'elles utilisaient des clones dont l'état sanitaire était connu par indexage mais aucune information relative à la présence d'autres virus que ceux du complexe du court-noué n'était disponible (WALTER B., MARTELLI GP., 1998).

Pour résoudre ce problème, d'autres études ont été menées en utilisant la thermothérapie (cf méthodes de lutte). L'intérêt est d'éliminer de manière séquentielle les virus coinfectant une vigne. Cependant, deux ou plusieurs virus peuvent être éliminés simultanément. Prenons pour exemple une étude australienne évaluant les pertes économiques dues au court-noué. La quantification de ces pertes a été envisagée en traitant à l'eau chaude une même vigne plantée selon trois protocoles. Le matériel de plantation a été soumis au traitement à l'eau chaude

(HWT : Hot Water Traitement) pour deux des plantations. Il n'a pas été réalisé de HWT pour la troisième plantation. Ce travail a montré une diminution de 30% de la productivité pour la troisième parcelle par rapport aux plants traités. Cependant aucune évaluation sur l'impact réel du HWT sur la virose n'a été effectuée. En d'autres termes, le HWT a un effet bénéfique sur l'intensité de l'expression de la maladie mais celle-ci n'est pas pour autant éradiquée et a probablement toujours un impact sur la productivité des ceps.

Enfin, l'évaluation des effets de virus a été faite en comparant des vignes non inoculées avec des vignes inoculées par greffage. On ne peut toujours pas être certain que les différences constatées soient dues uniquement au court-noué, puisque la vigne utilisée pour l'inoculation par greffage peut-être coïnfectée par d'autres viroses ou virus.

Dans le cas du GFLV, son vecteur spécifique *Xiphinema index* peut permettre d'obtenir un inoculum pur. Ce n'est pas le cas pour l'ArMV puisque son vecteur spécifique *X. diversicaudatum* peut également transmettre le SLRSV (Strawberry latent ringspot virus) qui infecte aussi la vigne.

On peut également obtenir un inoculum pur en utilisant des hôtes herbacés sélectifs et en inoculant ensuite le virus à la vigne. Nous détaillerons les hôtes herbacés sélectifs dans la partie indexage biologique.

Les résultats obtenus doivent donc être interprétés avec beaucoup de prudence et ne doivent pas aboutir à des conclusions éronnées.

Malgré ces difficultés un grand nombre de spécialistes évaluent les dégâts provoqués par le court-noué. Les résultats qui montrent les effets souvent dramatiques de cette virose sur la récolte de raisins dans de nombreux vignobles à travers le monde sont très nombreux. (WALTER B. ET MARTELLI G.-P., 1997). Ils peuvent varier beaucoup, tout comme les symptômes, en fonction de :

- la virulence de l'isolat viral,
- l'espèce et la variété de vigne,
- l'âge de la vigne,
- les conditions agro-climatiques,
- et enfin, l'état sanitaire de la vigne (interaction avec d'autres viroses ou d'autres agents pathogènes) posant tous les problèmes d'interprétation que nous venons de voir.

Citons quelques uns des résultats les plus intéressants compilés par B. WALTER en 2000 :

- “Vuittenez (1958) avait évalué l'effet du GFLV sur Chardonnay en comparant la récolte de parcelles dont le sol avait été désinfecté préalablement à l'aide d'un produit nématocide avec celle de parcelles non désinfectées et donc contaminées par le GFLV : 8,4 à 8,8 tonne par hectare dans le premier cas, pour 4,4 t/ha dans le deuxième”. Ici encore on tombe dans des difficultés d'interprétation puisque doit être prise en considération l'efficacité de la désinfection qui, comme nous l'aborderons plus loin, est loin d'éliminer la totalité des nématodes vecteurs, notamment dans les terrains lourds.
- “Des pertes provoquées par le GFLV ont été estimées à 77% sur Muscat à petit grain (BOUBALS *et al.*, résultats obtenus à Frontignan en 1963 et tirés du Progrès Agricole et Viticole, 1964).
- 75% sur Chardonnay (LEGIN, 1970),
- 44 à 94% sur Traminer (RÜDEL, 1984),
- 78% sur Chasselas, 87% sur merlot, 98% sur Pinot noir (Bovey, 1970).”

Plus récemment, le département agricole du gouvernement de l'ouest australien enregistre pour cette région des pertes moyennes de productivité de 50% et jusqu'à 60% pour certaines parcelles. (Department of agriculture ; Gouvernement of Western Austria, 2006).

De façon plus générale, une organisation de recherche gouvernementale australienne évalue entre 20 et 90% les baisses de productivité pour certains cultivars lors d'une infection par le complexe du court-noué (Australian government, 2004).

Peggy ANDRET-LINK, dans un article faisant l'état des connaissances en 2004 relate des pertes de productivité modéré (10%) à très élevée (80%). Elle cite également des observations de Raski *et al.*, 1983 et M. FUCHS (résultats non publiés) qui font état de cas extrêmes où la production est totalement anéantie. (ANDRET-LINK P. *et al.*, 2004).



Photo 59 : Déga^ts provoqués par le court-noué au sein d'une parcelle. (Source : DEMANGEAT G., 2007)

Les infections virales induisent chez la vigne des altérations physiologiques et structurales avec des modifications de :

- la teneur en chlorophylle, la photosynthèse, la respiration et le métabolisme des sucres,
- certaines activités enzymatiques telles que celles de phosphatases acides et de peroxydases,
- le transport phloématique,
- la balance hormonale en relation avec le métabolisme azoté,
- la nutrition minérale,
- le métabolisme cellulaire,
- la teneur en polyamines et notamment en putrescine.

Ces atteintes de la physiologie de la plante entraîne en plus des pertes quantitatives une modification de la qualité des fruits avec notamment une diminution substantielle de la teneur en sucre et une augmentation de l'acidité titrable (ANDRET-LINK P. *et al.*, 2004). Dans une grappe infectée la maturité des baies n'est pas égale et certaines ne muriront pas. Il faut donc faire un tri manuel pour obtenir une récolte homogènement mûre et limiter la diminution des taux de sucre des moûts. En plus de cette altération qualitative due au millerandage, de nombreuses études ont prouvé que la qualité des baies, même bien mûres, est altérée. La majorité des travaux ont porté sur les virus de l'enroulement et plus particulièrement sur le GLRaV-2 et le GLRaV-3 (KOMAR V. *et al.*, 2007 ; CRISTOV I. *et al.*, 2007 ; BERTAMINI *et al.*, 2004). La base de toutes ces études est l'évaluation de l'activité photosynthétique entre plantes saines et plantes infectées puisque la photosynthèse est au centre des réactions métaboliques.

Des chercheurs du département de biologie des îles baléares ont étudiés l'inhibition de la photosynthèse sur cépage Banyalbufar malmsey (*Vitis vinifera*) dans le cadre d'infections virales par le GFLV et le GLRaV-2. Le but de l'étude était d'avancer dans la compréhension des mécanismes par lesquels l'infection affecte la photosynthèse car ils sont relativement mals connus. Les résultats ont montrés une diminution de l'activité photosynthétique d'environ 50%. Elle serait liée principalement à une chute des activités de décarboxylation et probablement à une diminution de la conductivité dans les mésophylles. Les effets démontrés des virus sur la fermeture des stomates ne semblent pas avoir d'influence (SAMPOL B. *et al.*, 2003).

Une autre étude a été publiée en 2004 dans *J. Phytopathology* sur les effets de l'enroulement sur la photosynthèse de vignes cultivées en champ. Les résultats concernant la

physiopathologie de l'infection sont très pointus. Sans entrer dans le déroulement des étapes et les cascades réactionnelles de la photosynthèse qui seraient trop longues à détailler, nous pouvons noter quelques observations générales intéressantes obtenues lors de ce travail. L'infection virale diminue considérablement le rapport photosynthétique en fonction de la surface foliaire ainsi que le taux d'évaporation. Il est intéressant ici de noter que l'activité photosynthétique est calculée proportionnellement à la surface foliaire. En effet, outre les perturbations métaboliques, le court-noué en réduisant la vigueur des ceps induit automatiquement une diminution de cette fonction de la plante. Plus précisément, l'étude de différentes activités photosynthétiques dans des thylakoïdes isolés montre une inhibition des photosystèmes de type II alors que l'inhibition des photosystèmes de type I est marginale.

De plus, les auteurs mettent le doigt sur les problèmes d'interprétation des résultats concernant l'évaluation des dégâts provoqués, comme nous l'avons souligné en début de chapitre. Ces dernières années, certaines filières horticolas s'interrogent sur le risque de voir la qualité des raisins diminuée avec des clones de vignes exempt de virus, ceux-ci étant plus vigoureux et productifs que les clones originaux. En effet, nous savons que l'absence de virus augmente la vigueur du cep et, par conséquent, sa productivité. Sous les climats chauds, ces modifications des paramètres végétatifs chez les plants sains n'affectent pas la composition des jus, c'est-à-dire teneur en sucre et acidité (WOODHAM *et al.*, 1984 ; CONRADIE *et al.*, 1989). Les résultats obtenus dans les zones tempérées, comme c'est le cas pour beaucoup de régions d'Europe, sont plus douteux (BASLER et BRUGGER, 1981 ; BALTHAZARD, 1993 ; MANNINI *et al.*, 1993, 1994 ; BERTAMINI M. *et al.*, 2004).

C'est ainsi que certains auteurs ont conclu que l'infection virale aboutit à une augmentation de la teneur en sucre du moût. Prenons, par exemple, les résultats obtenus par Balthazard en 1993 montrant qu'une évaluation précise des résultats expérimentaux éliminent cette conclusion incorrecte (BALTHAZARD A., 1993). Il a comparé des plants d'un clone de Savagnin rose après traitement par la chaleur (thermothérapie) ayant permis d'éliminer la virose de l'enroulement, avec des plants du même clone avant traitement : il a montré que la diminution de la teneur en sucre observée après traitement était uniquement due à la différence de rendement, les ceps non virosés (après traitement) portant plus de raisin que les ceps virosés. Si l'on calcule des coefficients de régression à partir des valeurs brutes, la différence de la teneur en sucre n'est plus significative.

Il est donc dangereux et inutile d'envisager – comme le font parfois certains – d'utiliser des virus ou des viroses pour contrôler la vigueur et le niveau de production d'une vigne. (WALTER B., 2000).

Le court-noué entraîne aussi des problèmes pour la replantation. Nous verrons dans la partie épidémiologie que les nématodes vecteurs peuvent perdurer très longtemps dans le sol tout en restant virulifères. Le délai après arrachage pour la replantation d'une jeune vigne dépend de nombreux paramètres et est difficile à calculer précisément, mais il semble qu'il faudrait attendre au moins 8 ans (nous détaillerons différentes études dans la partie épidémiologie quant à ce délai) pour pouvoir réintroduire de jeunes ceps sans risque de recontamination immédiate. Ainsi, des replants mis de manière répétée par les vigneron dans de vieux vignobles infectés ne portent jamais un grain de raisin : l'infection rapide par l'ArMV ou le GFLV empêche la moindre production. De tels phénomènes sont très visibles dans le sud de la France : le vignoble de la région d'Uzès (département du gars) ou encore les vignes de muscat de rivesalte dans l'arrière pays de Montpellier sont des exemples tirés d'observations personnelles. Des études anciennes montrent un taux de contamination de 5% sur une parcelle replantée après 5 ans de repos du sol (DESCOINS C., 2005).

Le GFLV a également un effet négatif sur la quantité de bois récolté sur des pieds d'hybrides porte-greffes. La diminution mesurée par rapport à des pieds non infectés allant jusqu'à 46% de la récolte de bois (BABINI A.-R. *et al.*, 1981). Pour compléter cette énumération des dégâts causés, il ne faut pas oublier les fortes diminutions de la reprise au greffage, ainsi que la diminution de la capacité des boutures de porte-greffes infectés à s'enraciner (ANDRET-LINK P. *et al.*, 2004). Il a également été observé en Australie le déclin et la mort des greffons ou des porte-greffes dans le cadre d'infections par le court-noué (Australian government, 2004). Bernard WALTER rapportent des diminutions de la reprise au greffage passant de 30-45% pour des porte-greffes SO4 non infectés à 6-10% pour des SO4 infectés par le GFLV et auxquels sont associés des greffons de riesling. Il s'appuie également sur les observations de BRÜCKBAUER en 1962. Ce dernier constatait que le pourcentage de bouture de SO4 qui développent des racines passe de 75% pour des sources non infectées à 25% pour des sources fortement infectées par le GFLV.

NB : Dans la littérature on trouve souvent employé le terme d'incompatibilité au greffage (graft incompatibility). Il ne devrait pas être utilisé dans ce cas. En effet, l'incompatibilité au greffage est une autre maladie de la vigne comme nous l'avons précisé en première partie. L'usage de ce terme, ici, peut prêter à confusion, les virus du court-noué n'étant, pour l'instant du moins, pas évoqués comme responsables de ce syndrome. Il est donc convenable de parler de "diminution de la reprise au greffage".

Enfin, et pour conclure ce chapitre, la virose du court-noué diminue fortement la résistance des ceps aux conditions climatiques défavorables. On observe ainsi un dépérissement important des ceps contaminés lors de périodes de grande chaleur avec un stress hydrique important (Extended abstracts 15th ICVG, 2006). Comme nous l'avons déjà dit en introduction à la 2^{ème} partie, la mort des ceps est de toute façon l'issue de la maladie et elle peut même survenir très rapidement. Quoi qu'il en soit, le temps moyen de productivité d'une vigne infectée est globalement divisé par 2, avec les pertes économiques que cela engendre.

B - Les virus en causes

1 - Taxonomie et présentation du genre *Nepovirus*

a – Le genre *Nepovirus*

Les virus de la dégénérescence infectieuse, dont le GFLV et l'ArMV, ont été à l'origine inclus dans le groupe des Népovirus, inexistant en taxonomie, qui a par la suite donné naissance au genre *Nepovirus*. Ce genre appartient à la famille des *Comoviridae* qui comprend également les genres *Fabavirus* et *Comovirus* en accord avec les homologies de séquences retrouvées. Les virus de plantes appartenant aux familles *Comoviridae* et *Sequiviridae*, et les virus des populations animales appartenant aux *Picornaviridae* ont une organisation similaire de leur capsid. Ces trois familles de virus ont donc été groupées (avec les *Polyviridae* et les *Caliciviridae*) dans le super-groupe des virus Picorna-like, de pertinence taxonomique incertaine. Il est caractérisé, en plus d'une organisation similaire, par des homologies de séquences dans des domaines codant pour l'hélicase, la Vpg (une protéine virale), la protéinase et la polymérase (LAPIERRE H., 2005).

Le groupe des Népovirus est divisé en trois sous-groupes selon les propriétés physico-chimiques des virus. Le GFLV et l'ArMV appartiennent au sous-groupe A représenté par le TRSV (Tobacco ringspot virus) (MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006), (LAPIERRE H., 2005).

Il faut préciser que le *strawberry latent virus* (SLRSV), transmis spécifiquement par *X. diversicaudatum*, a été considéré comme un membre atypique du genre *Nepovirus*. Ce virus qui possède une capsid constituée de deux sous-unités de tailles différentes et des

homologies de séquences avec les virus du genre *Cheravirus* et ceux des familles *Sequiviridae*, *Comoviridae*, *Picornaviridae*, est maintenant assigné au genre *Sadwavirus*. Ce genre, tout comme les *Cheravirus*, n'est pour le moment rattaché à aucune famille ou ordre (LE GALL O. *et al*, 2007).

Les *Nepovirus* ont une gamme d'hôtes naturels très large. Cette gamme s'étend des plantes sauvages aux plantes cultivées annuelles ou pérennes (ICTVdB management, 2006). Les hôtes sont des plantes appartenant au *phylum Magnoliophyta* (angiospermes, classe *Magnoliopsida*, (dicotylédones)). Soixante trois familles contiennent des espèces suceptibles d'être infectées ce qui montre l'étendue de la gamme d'hôtes naturels du genre *Nepovirus*. Les *Nepovirus* infectant la vigne et à l'origine de dégénérescence ou de dépérissement sont transmis par des nématodes vecteurs (cf tableau première partie) appartenant à trois genres : *Longidorus*, *Paralongidorus* et *Xiphinema* appartenant à la famille des *Longidoridae*. La gamme d'hôtes pour ces virus est étroitement liée à celle de leurs vecteurs associés et peut ainsi être très étroite pour un virus donné. En effet, le seul hôte naturel connu du GFLV est la vigne qui est également un des seuls hôtes naturels de *X. index*. En revanche, l'ArMV, transmis spéciquement par *X. diversicaudatum*, a une gamme d'hôte beaucoup plus large (arbres fruitiers, plantes à petits fruits, arbres et arbustes ornementaux, cultures légumières, adventices) parce que le nématode vecteur est beaucoup plus polyphage que *X. index*.

Seulement un tiers des *Nepovirus* est transmis par les nématodes ectoparasites. Bien qu'il existe pour plusieurs autres *Nepovirus* des évidences de transmission via le sol impliquant des nematodes, le mode de transmission naturel des autres *Nepovirus* est encore mal connu. Cependant, leur dissémination peut être assurée pour certains par le pollen ou la graine.

Après cette brève présentation du genre *Nepovirus*, nous nous intéresserons plus particulièrement au complexe du court noué. Depuis la description de la maladie en 1865 par CAZALIS-ALLUT, plus de milles publications traitant du GFLV ont été regroupés par l'ICVG. L'ArMV à lui aussi fait l'objet de nombreuses publications. Nous détaillerons la biologie de ces virus très proches en s'appuyant principalement sur les études menées sur le GFLV puisqu'elles sont plus nombreuses.

b - Historique des découvertes sur le GFLV et l'ArMV.

Les principales étapes dans l'évolution des connaissances sur le GFLV et l'ArMV sont résumées dans ce paragraphe. Elles nous permettront de bien comprendre ou en sont les connaissances afin de mieux cerner les enjeux actuels de la recherche sur le court-noué.

De 1865 à 1896 CAZALIS-ALLUT puis RATHAY et RUGGERI et enfin CHOLIN ont décrit le court noué en France, Autriche, Italie et Allemagne respectivement. (CAZALIS-ALLUT L.C., 1865 ; RATHAY E., 1882 ; CHOLIN J.J., 1896).

Dès 1902, en s'appuyant sur les récentes découvertes de BEJERINCK sur le *contagium vivum fluidum* (1898), BACCARINI émet pour la première fois l'hypothèse que le court noué est du à un virus (BACCARINI P., 1902). En 1906, SCHIFF-GIORGINI transmet le court noué par greffage (SCHIFF-GIORGINI R., 1906).

Dès 1910, PANTANELLI affirme qu'il est transmis par le sol (PANTANELLI E., 1912). La première mise en évidence expérimentale confirmant cette transmission a été obtenue par PETRI en 1918. Il prouve que la désinfection à 120°C des sols contaminés, ou la filtration des eaux provenant de ces sols à travers des filtres de porcelaine, prévient des infections par les racines de la vigne. Par contre, à l'issue de ces expériences il émet une hypothèse fautive comme quoi le court noué pourrait être une maladie fongique. Il dément ceci en 1929 disant que l'"arricciamento" (court noué en italien) a une origine virale (PETRI L., 1929). Dans les années 30, l'origine virale de la maladie semble admise par tout le corps scientifique. En 1937, ARNAUD confirme que la dégénérescence infectieuse est une maladie causée par un virus venant du sol. Il émet la possibilité que le phylloxera soit impliqué comme vecteur (ARNAUD G., 1937). Jusqu'à la fin des années 40 cette piste va être testée, notamment par BRANAS et al (BRANAS *et al.*, 1937).

En 1950, HEWITT décrit des symptômes de "fanleaf" et "yellow mosaic" en Californie sur des *Vitis* américains (HEWITT W.B., 1950). En 1958, des découvertes importantes vont révolutionner les connaissances de la maladie. BOVEY publie les premiers résultats positifs de traitement par la chaleur avec une élimination temporaire des symptômes sur les nouvelles pousses (BOVEY R., 1958). De son côté, VUITTENEZ prouve que la fumigation des sols contaminés avec des nématicides prévient de l'infection les jeunes plants sains replantés immédiatement, alors qu'un traitement insecticide n'a aucun effet (VUITTENEZ A., 1958). Enfin, cette même année, HEWITT *et al.* démontrent que le court-noué est transmis par le nématode *Xiphinema index* (HEWITT W.B. *et al.*, 1958).

En 1960, CADMAN *et al.* réussissent à transmettre le GFLV à des hôtes herbacés par inoculation mécanique et ainsi à caractériser certaines propriétés biologiques et sérologiques de ce virus. En effet, ils identifient pour la première fois le virus par microscopie électronique

après purification partielle à partir d'un plant de *Chenopodium amaranticolor* infecté. Ils essayent également de retransférer le GFLV de l'hôte herbacé à la vigne, mais aucun symptôme ne se développe sur l'hôte naturel (CADMAN C.H. *et al.*, 1960).

En 1961, BRÜCKBAUER et RÜDEL mettent en évidence la transmission par la graine du ou des virus du court-noué dans des indicateurs herbacés. Ils se posent la question d'un rôle éventuel des adventices sur l'épidémiologie de la maladie.

C'est seulement en 1962 que HEWITT transmet le GFLV d'une vigne à *C. amaranticolor* pour le retransmettre ensuite à la vigne en utilisant *X. index* comme vecteur. Des symptômes typiques de court noué se développent sur la vigne réinfestée. Ces expériences démontrent formellement que le GFLV est l'agent causal du "fanleaf degeneration disease" (HEWITT *et al.*, 1962).

En 1963, des symptômes typiques de dégénérescence infectieuse sont mis en évidence sur des vignes après transmission par greffage à partir de *C. amaranticolor* infectés par le GFLV. Le virus a également été transmis avec succès de vignes symptomatiques à *C. amaranticolor* (DIAS, 1963). Ces mêmes expériences amènent DIAS et HARRISON à établir une relation entre les virus provoquant les symptômes de "fanleaf" et "yellow mosaic" et l'ArMV (DIAS et HARRISON, 1963).

Ce sont ces découvertes du début des années 1960, prouvant en particulier que la dégénérescence infectieuse n'était pas liée au phylloxera, qui ont conduit des scientifiques à fonder le Conseil International pour l'étude des maladies Virales et pseudo-virales (viroïdales) de la Vigne (International Council for the Study of Virus and Virus-like Disease of the Grapevine : ICVG) en 1964. Cette organisation qui réunit les connaissances et observations du monde entier, publie tous les quatre ans, suite à un congrès regroupant les plus grands spécialistes, une liste des articles ou extraits qui ont apportés de nouvelles connaissances et observations. Ces articles sont une base de travail dans le domaine.

Depuis les années 60, la recherche sur le GFLV est en permanence plus active. Depuis que la spécificité d'interaction entre le GFLV et *X. index* a été comprise au niveau moléculaire (ANDRET-LINK P. *et al.*, 2004 (b) ; ANDRET-LINK P., 2005) et que le génome du virus a été entièrement séquencé, la diversité génétique du virus est au centre des recherches puisque la transgénése semble, à l'heure actuelle, le seul espoir de lutte réellement efficace.

Pour ce qui concerne l'ArMV, le virus commence à être étudié avec plus d'intérêt en viticulture à partir de 1963, suite à la découverte de DIAS et HARRISON. Cette année là, il est détecté sur une vigne en Yougoslavie puis, en 1968, en Hongrie. En 1972, DALMASSO identifie *Xiphinima diversicaudatum* comme vecteur de l'ArMV (DALMASSO A, 1972).

Depuis ces étapes clefs dans la connaissance de ce virus, celui-ci est très étudié, presque autant que le GFLV. En effet, c'est l'un des rares virus de plante à être lui aussi entièrement séquencé (WETZEL T. *et al.*, 2001). Le processus de maturation des polyprotéines a également été étudié pour l'ArMV. Bien sûr, à l'heure actuelle les recherches sur la diversité génétique des souches virales sont très actives dans le but de lutter contre la maladie en modifiant génétiquement la vigne.

2 - Structure et expression du génome viral

Les virus de la famille des *Comoviridae* sont des particules virales polyhédriques ou icosaédriques avec un diamètre variant de 28 à 30 nm. (FATEMEH MAGHULY *et al.*, 2005). La capsid des *nepovirus* est typiquement composée de 60 sous-unités d'un seul polypeptide variant de 52 à 60 kDa (LE GALL O. *et al.*, 2005). Une structure cristallographique a été obtenue pour le membre type des *Nepovirus*, le tobacco ringspot virus (TRSV). La résolution du cristal de TRSV suggère que la sous-unité de la capsid des *Nepovirus* est repliée en trois domaines identiques adoptant un repliement communément appelé « jelly-roll ». Les soixantes sous-unités sont associées entre elles pour former une capsid selon une organisation pseudo T = 3. Les particules virales protègent le génome viral qui est constitué de deux ARN, ARN 1 et 2, simple brin de polarité positive. L'extrémité 5' de chaque ARN est liée de manière covalente à une protéine virale, la Vpg, et l'extrémité 3' est polyadénylée. Les deux ARN génomiques sont nécessaires pour déclencher une infection mais l'ARN 1 seul est capable de se répliquer dans les protoplastes de plantes.

Certains isolats de *Nepovirus*, comme la souche F13 du GFLV, possèdent un ARN supplémentaire que l'on appelle ARN satellite ou RNA3, qui est encapsidé dans les mêmes particules virales que les ARN génomiques. Il code pour une protéine (P3) de fonction inconnue (FUCHS M. *et al.*, 1989). P3 semble tout de même nécessaire pour la réplication de l'ARN3 (HANS *et al.*, 1992, 1993). HANS *et al.* ont également montré que l'ARN3 nécessite la présence des 2 ARN génomiques pour sa réplication et son encapsidation. L'ArMV peut lui aussi comporter, selon les souches, des ARN satellites. Deux types d'ARN satellites ont été identifiés : l'un linéaire et l'autre circulaire. Comme pour le GFLV leur fonction est encore mal connue.

Chaque ARN est traduit en une polyprotéine qui est clivée en protéines fonctionnelles grâce à une protéase codée par l'ARN 1. Ce processus de maturation des polyprotéines a été

étudié entre autre pour l'ArMV, le tomato black ring virus (TBRV), le GFLV et le tomato ringspot virus (ToRSV), principalement *in vitro*. En plus de la sous-unité de la capsid, identifiée dans les plantes pour la plupart des *Nepovirus*, certains des produits de maturation ont été mis en évidence *in vivo*. Le GFLV, avec le ToRSV, est l'un des *Nepovirus* pour lequel les connaissances sur la structure et l'expression du génome sont les plus avancées.

Les particules nucléoprotéiques du GFLV ont un diamètre de 28nm et sédimentent en gradient de saccharose en 3 fractions distinctes qui correspondent à la même coque protéique mais d'un contenu en acides nucléiques variable. Elles sont appelées « top »(T), « middle »(M), et « bottom »(B). La fraction T est constituée de particules vides, la fraction M de particules contenant le RNA 2 et la fraction B de particules contenant les deux ARN (1 et 2). L'ARN génomique 1 code pour une polyprotéine notée P1 de masse moléculaire 253 kDa et l'ARN génomique 2 pour la polyprotéine P2 de masse moléculaire 122 kDa (figure 3). Les deux polyprotéines sont clivées en protéines fonctionnelles par une protéinase codée par le RNA1 (BASHIR N., 2006).

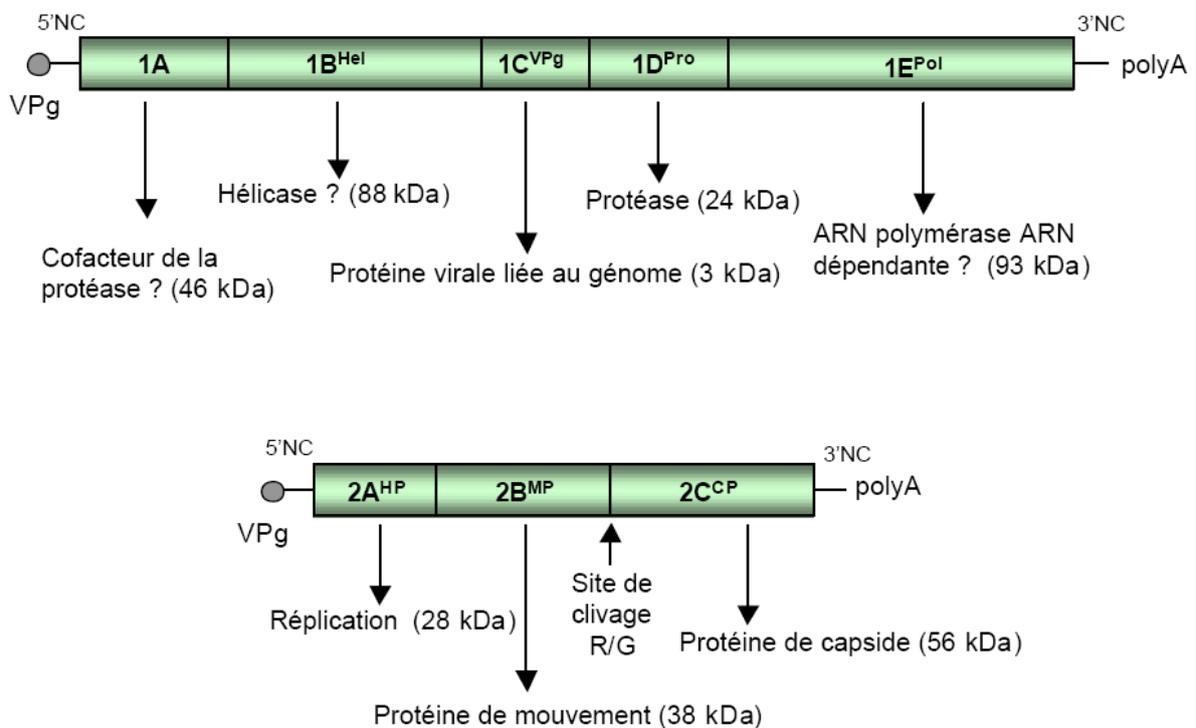


Figure 2 - Structure et expression des ARN 1 et 2 du *grapevine fanleaf virus*. Un point d'interrogation est associé aux protéines pour lesquelles la fonction suspectée n'a pas été démontrée expérimentalement. (Source : ANDRET-LINK P., 2005).

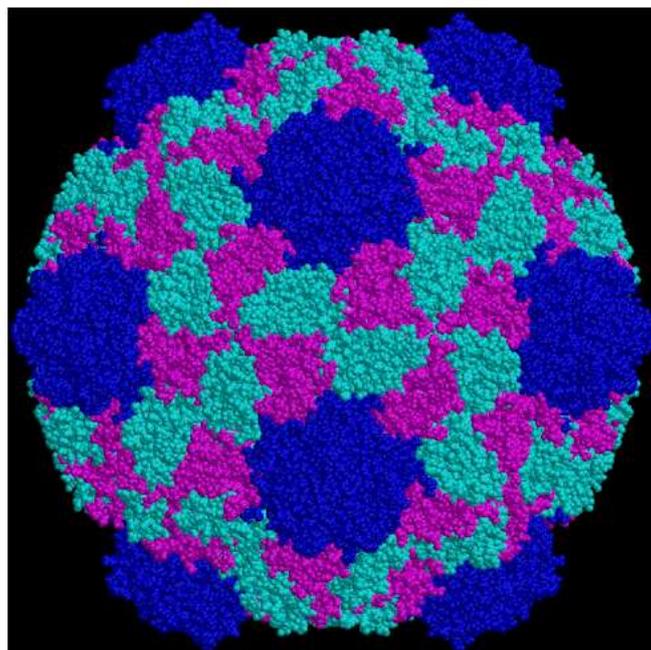
Cinq produits de maturation résultent du clivage de la polyprotéine P1 : la protéine 1A (46 kDa), 1B^{Hel} (88 kDa), 1C^{VPg} (3 kDa), 1D^{pro} (24kDa) et 1E^{pol} (92kDa), en partant de l'extrémité n-terminale vers l'extrémité c-terminale de P1. Ces protéines sont libérées par un clivage en *cis* au niveau de sites spécifiques identifiés par l'action de la protéine 1D^{pro}. Des comparaisons de séquences avec des virus très proches du GFLV incluant des *Nepo*-, *Como*-, et *Picornavirus* ont été réalisées pour essayer de comprendre les fonctions de ces protéines (PINCK M. *et al.*, 1991). Les résultats suggèrent que la protéine 1A soit un cofacteur de la protéase. La protéine 1B^{hel}, qui possède un domaine de fixation des nucléotides, est supposée être une hélicase alors que la présence d'un motif GDD permet de proposer une fonction polymérase RNA-dépendante pour la protéine 1E^{pol} (RITZENTHALER C. *et al.*, 1991). L'étude de l'expression du génome du GFLV a montré que 1C^{VPg} est liée de manière covalente à l'ARN viral (PINCK M. *et al.*, 1991). La maturation des polyprotéines a été attribuée à la protéine 1D^{pro} (DEMANGEAT *et al.*, 2006).

Le clivage de la polyprotéine P2 est réalisé en trans par la protéase 1D^{pro}. Il conduit à la formation de 3 protéines matures : 2A^{HP} (28 kDa), 2B^{MP} (38 kDa) et 2C^{CP} (56kDa) en allant de l'extrémité N- à C-terminale. La protéine 2A est nécessaire à la réplication du RNA2. Elle pourrait avoir un rôle sur l'adressage du RNA2 ou de P2 vers un site périnucléaire correspondant au site de réplication du virus (GAIRE F. *et al.*, 1999). La protéine 2B^{MP} est la protéine de mouvement et un constituant des structures tubulaires qui partent de la paroi cellulaire et sont observées dans des plasmodesmes modifiés de cellules infectées par le GFLV. La protéine 2C^{CP} est la protéine de capsid. Une étude récente a permis de construire un modèle tridimensionnel de la capsid du GFLV en se basant sur la structure cristallographique du Tobacco ringspot virus (TRSV). Il montre que la capsid du GFLV est composée de 60 copies de la protéine 2C^{CP} formant 3 domaines arrangés selon une organisation pseudo T = 3. Ces domaines sont des feuillets β et sont désignés C, B et A de l'extrémité N- à l'extrémité C-terminale. Ils sont liés entre eux par des liaisons covalentes (cf illustration) (FUCHS M., 2003) (ANDRET-LINK P., 2005).



Figure 3 - Représentation dans l'espace de la structure de la protéine de capsid du TRSV. (Source : FUCHS M., 2003 et ANDRET-LINK P., 2005).

Sur la figure 3, les couleurs de l'arc en ciel du bleu au rouge donnent le sens de parcours de l'extrémité N- terminale vers l'extrémité C-terminale de la protéine. Les flèches représentent les feuilletts β et les spirales représentent les hélices α .



Domaine A ■ Domaine B ■ Domaine C ■

Figure 4 - représentation de la capsid du TRSV. (Source : ANDRET-LINK P., 2005)

3 - Multiplication du virus

Nous savons que les virus se répliquent à l'aide de la machinerie cellulaire de la cellule infectée. Les phytovirus à ARN utilisent des membranes cellulaires de plusieurs origines venant du système endomembranaire, des chloroplastes, des mitochondries, etc. Les cellules infectées par le GFLV montrent une prolifération massive des membranes qui s'accumulent à la périphérie du noyau pour former un compartiment viral, appelé compartiment périnucléaire. En 2002, RITZENTHALER et al. ont identifié ce compartiment par microscopie immunoconfocale comme étant le site de réplication du virus puisqu'il contient les Vpg codées par le RNA1 nécessaires pour la réplication, les RNA viraux nouvellement synthétisés et des formes répliquatives double brin. De plus, en utilisant des cellules transgéniques de tabac (protoplastes T-BY2) exprimant une protéine marqueur fluorescente (la GFP : Green Fluorescent Protein) dans le réticulum endoplasmique ou dans l'appareil de Golgi, ils ont pu montrer directement que la réplication du GFLV induit une déplétion du RE associée à une condensation et à une redistribution des membranes dérivées du réticulum, pour générer le compartiment viral. Dans ce même travail, la brefeldin A, une drogue connue pour inhiber le trafic entre le Golgi et le Réticulum s'est révélée inhibitrice de la réplication du GFLV. Une autre molécule, la Cérulénine, inhibant la synthèse *de novo* des phospholipides, a elle aussi inhibé la réplication du GFLV. Ces observations prouvent que la réplication du virus dépend des deux paramètres : le recrutement des membranes dérivées du RE et la synthèse *de novo* des lipides (RITZENHALER *et al.*, 2002). La polyprotéine P1 est indispensable pour la réplication du RNA viral et est responsable de la formation du compartiment viral, bien que le/les produit(s) de maturation responsable(s) du recrutement des vésicules provenant du RE ne sont pas caractérisés.

Le RNA2 est répliqué par la machinerie codée par le RNA1. Il a été montré que la protéine 2A est nécessaire mais ne suffit pas à la réplication du RNA2. L'expression d'une protéine de fusion 2A:GFP dans des cellules saines ou infectées par le GFLV démontre que la protéine 2A s'accumule dans le compartiment viral. Il a été envisagé que la protéine 2A pourrait commander le transport des complexes P2-RNA2 naissants de leur localisation initiale dans le cytosol vers les sites de réplication périnucléaires (GAIRE *et al.*, 1999).

4 - Mouvement du virus de cellule à cellule

Les particules virales, une fois répliquées au niveau du compartiment viral, doivent migrer vers la périphérie de la cellule et plus particulièrement vers les plasmodesmes au travers desquels elles véhiculent pour infecter les cellules voisines. La première phase du mouvement du GFLV peut être schématisée en deux étapes : la migration intracellulaire des particules virales du site périnucléaire vers la périphérie de la cellule et ensuite le mouvement intercellulaire à travers la paroi. Nous allons essayer de résumer les mécanismes aboutissant à l'infection systémique de la plante, en s'appuyant principalement sur les études suivantes :

VALAT L. *et al.*, 2005 ; DING B., 1998 ; LAPORTE C. *et al.* 2003 (Cet article est très complet et extrêmement intéressant pour ceux qui veulent en savoir plus sur la biologie et plus particulièrement le rôle de la MP du GFLV. Les images de microscopie présentées plus loin dans ce chapitre sont tirées de ce document) ; GAIRE F. *et al.*, 1999 ; BELIN C. *et al.*, 1999 ; RITZENTHALER C. *et al.*, 2002 ; RINTZENTHALER C., PINCK M. *et al.*, 1995 ; VIRY M. SERGHINI M A. *et al.*, 1993.

Cette synthèse s'appuie, en plus des articles cités ci dessus, sur le travail de thèse de Peggy ANDRET-LINK présenté à la faculté des sciences de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg.

Pour comprendre le mécanisme de transport du GFLV, il a d'abord fallu identifier la protéine de mouvement. Ce sont RITZENTHALER et ses collègues qui attribuèrent ce rôle à la protéine 2B^{MP} (ou MP pour Movement Protein) en 1995 (RITZENTHALER *et al.*, 1995). Cette protéine très stable ne s'accumule pas dans le compartiment viral (RITZENTHALER *et al.*, 1995, 2002) mais forme des tubules remplis de virions. Dans les expériences réalisées sur des protoplastes infectés, les tubules forment des protubérences à leur surface. Dans le cas de cellules infectées les tubules sont imbriqués dans des plasmodesmes hautement modifiés (RITZENTHALER *et al.*, 1995).

Pour mieux comprendre la suite, il paraît nécessaire de faire une brève parenthèse sur la structure et le rôle des plasmodesmes de façon générale, c'est-à-dire en dehors du contexte de l'infection par le GFLV ou les autres népovirus de la dégénérescence infectieuse. Lors de la morphogénèse, des groupes de cellules se différencient pour former des tissus spécialisés possédant des structures et des fonctions différentes. La spécialisation cellulaire ou différenciation est le résultat de l'expression spécifique du génôme au niveau de chaque

cellule. La coordination de l'expression des gènes entre les cellules nécessite que celles-ci communiquent entre elles. Ce sont les plasmodesmes qui constituent un pont ou chemin cytoplasmique pour la communication directe entre les cellules. Les découvertes récentes montrent que des macromolécules comme des facteurs de transcription, des protéines du système immunitaire et aussi (comme nous venons de le voir pour le GFLV) les protéines virales, peuvent véhiculer par les plasmodesmes (DING B., 1998). Ceci suggère que le mouvement intercellulaire des protéines est un élément important dans la régulation des processus de développement de la plante, des fonctions physiologiques, des interactions plante-pathogène et des réactions de défense (cf figure 5).

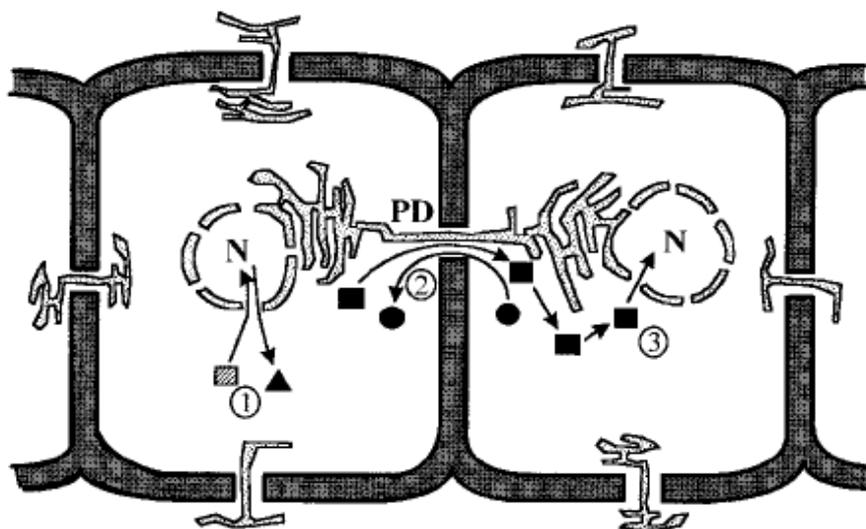


Figure 5 : rôle des plasmodesmes au niveau de l'expression génique de deux cellules voisines, en particulier dans le transport des facteurs de transcription. (Source DING B., 1998).

Le rôle des plasmodesmes ayant été explicité, revenons au mouvement du GFLV. RITZENTHALER a montré que les tubules formés par la MP (protéine de mouvement) étaient imbriqués dans des plasmodesmes hautement modifiés. En effet, le diamètre normal d'un plasmodesme est d'environ 2,5 nm et nous avons vu que la taille de la particule virale du GFLV est de 28nm et de façon plus générale entre 28 et 30nm pour les népovirus. Il est donc impossible que le virion diffuse simplement par le canal sans une modification de structure qui résulte de l'interaction entre la MP et les plasmodesmes (PD). Le virion passe donc dans la lumière du tubule formé par l'assemblage des MP et le tubule est lui-même inséré dans un

plasmodesme. La structure schématique d'un plasmodesme est présentée ci-dessous (d'après DING B., 1998).

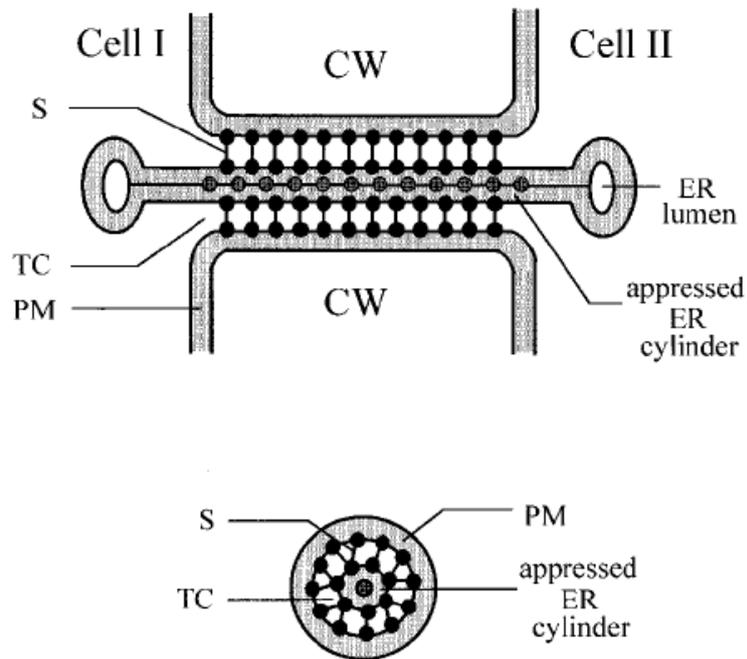


Figure 6 : modèle schématique de la structure d'un plasmodesme basée sur des études réalisées sur des cellules de mésophylles et des cellules vasculaires de tabac. Vue médiane longitudinale en haut, et vue en coupe en bas. S : extensions connectant le RE à la membrane plasmique (PM). CW : Cross wall (jonction cellulaire). TC : putative transport channels (canal de transport probable pour les macromolécules). (Source : DING B., 1998)

L'assemblage de la MP en tubule et le passage de l'ARN viral par un plasmodesme est représentée ci-dessous (UNIVERSITE DE TOURS) avec le CPMV, un virus dont les caractéristiques du mouvement de cellules à cellules sont très proches.

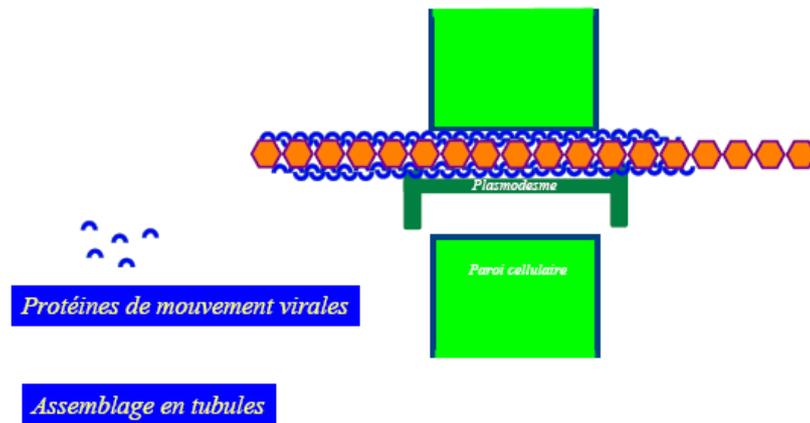


Figure 7 : assemblage de la MP en tubules pour permettre le passage de l'ARN viral. (Source : Université de Tours).

BELIN *et al.* ont montré que le mouvement du GFLV de cellule à cellule nécessite la présence simultanée de la MP et de la CP, alors que ce n'est pas le cas pour la réplication du virus. Pour comprendre le rôle de ces deux protéines dans le mouvement du virus, ils ont construit des mutants du RNA2 du GFLV en remplaçant alternativement les gènes codant pour la 2BMP et la 2CCP par les gènes correspondants de l'ARMV. Les transcrits de tous les RNA2 chimériques étaient capables de se répliquer dans des protoplastes de *C. quinoa* et de former des tubules dans des protoplastes BY-2 de tabac en présence du transcrit infectieux du RNA1 du GFLV. Des particules virales ont été produites quand le gène 2CCP du GFLV était remplacé par celui de l'ARMV mais on n'observait pas d'infection systémique dans les plants de *C. quinoa*. De plus, les RNA2 chimériques contenant le gène complet de l'ARMV pour la 2BMP n'étaient ni encapsidés ni infectieux dans les plantes probablement parce que la polyprotéine P2 n'était pas fonctionnelle. Cependant, des RNA2 chimériques construits avec un gène tronqué de l'ArMV pour la 2BMP dans lequel les résidus C-terminaux étaient ceux du gène 2BMP du GFLV ont conduit à la formation de particules virales et étaient infectieux en présence de la protéine 2CCP du GFLV, mais non infectieux en présence de la protéine 2CCP de l'ArMV. Ces résultats montrent donc bien que la MP et la CP doivent être présentes simultanément pour obtenir une infection systémique. Ils permettent même d'aller plus loin et suggèrent que les résidus C-terminaux de la 2BMP doivent être de la même origine virale que la protéinase pour que le clivage de la polyprotéine P2 soit efficace, et de la même origine virale que la 2CCP pour la diffusion du virus. Plus récemment, le travail réalisé sur la lignée transgénique de cellules de tabac BY-2 exprimant une protéine MP marquée (GFP:MP) a permis de démontrer qu'aucune autre protéine virale n'intervient dans la formation des tubules (LAPORTE *et al.*, 2003). Cette même lignée cellulaire a permis de réaliser une analyse

spatio-temporelle du transport de la GFP:MP dans la cellule et de l'assemblage de cette protéine en tubules. Comme nous le savons, la MP est attirée vers un site de liaison au plasmodesme, mais le mécanisme de ce ciblage reste pour le moment inconnu. Par contre LAPORTE *et al.* ont pu montrer grâce à cette étude que la GFP:MP est dirigée préférentiellement vers des sites à calreticuline dans les parois intercellulaires les plus jeunes. De plus, la GFP:MP s'accumule au niveau de la plaque cellulaire avec une syntaxine cytokinétique (KNOLLE) lors de la division cellulaire.

Un traitement avec plusieurs drogues semble montrer qu'un ciblage correct de la GFP-MP pour les sites à calreticuline nécessite un appareil sécrétoire fonctionnel et est dépendant du cytosquelette, alors que la formation des tubules est indépendante de celui-ci. Les analyses biochimiques ont montré qu'au moins une fraction des protéines de mouvement se comporte comme les protéines membranaires. Ces résultats laissent envisager un modèle dans lequel la MP serait transportée vers les sites spécifiques *via* les vésicules du Golgi par deux voies différentes : une voie dépendante des microtubules dans les cellules normales et une voie dépendante des microfilaments, utilisée par défaut quand les microtubules sont dépolymérisés.

Pour mieux comprendre ce mécanisme de transport de la MP nous allons l'illustrer à l'aide des images obtenues avec la GFP:MP dans les travaux de LAPORTE C. *et al.* en 2003.

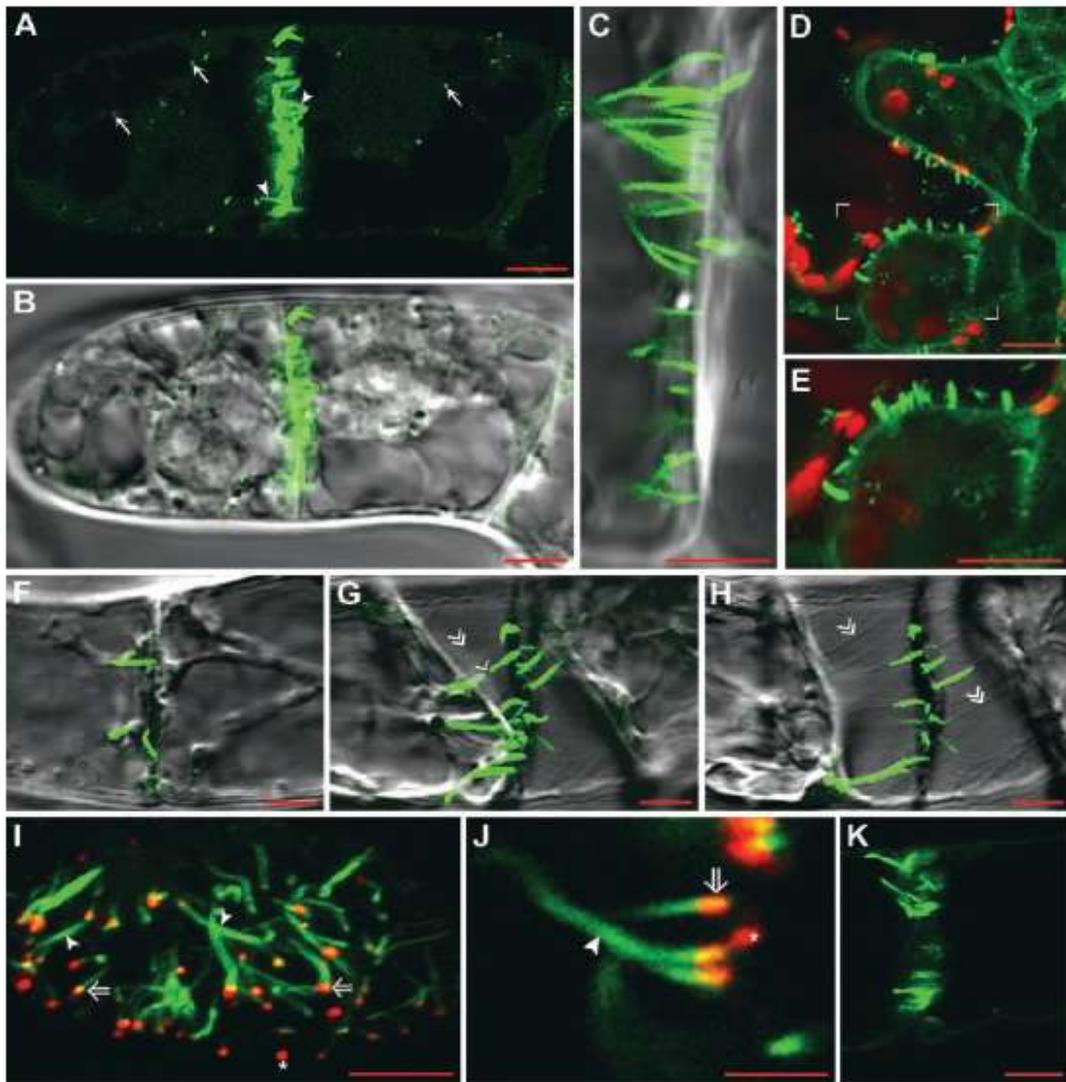


Figure 8 : Analyses en CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) des cellules 2B15, 24 heures après induction. (source : LAPORTE *et al.*, 2003)

(A) à (C) Localisation de la GFP:MP dans les cellules vivantes

(A) structures filiformes fluorescentes (curseur) visibles au niveau des jonctions cellulaires. Corps isolés fluorescents visibles dans le cytoplasme (flèche)

(B) image composite entre (A) et une image à contraste différentiel

(C) Vue détaillée d'une jonction cellulaire au niveau de laquelle apparaissent des structures fluorescentes tubulaires orientées.

(D) et (E) Localisation de la GFP:MP dans des cellules de feuilles de *Nicotiana benthamiana*. Observation faite 24h après l'induction des cellules elle-même réalisée 3 jours après agroinfiltration.

(D) Lignes fluorescentes observées au niveau des jonctions entre 2 cellules épidermiques. Les chloroplastes apparaissent en rouge.

(E) détail de la région d'intérêt de l'image (D)

(F) à (H) comportement des structures tubulaires fluorescentes durant la plasmolyse. Du mannitol (0,45M) a été ajouté pour induire la plasmolyse. Celle-ci est suivie par microscopie à différents moment après l'addition du mannitol : (F) avant addition, (G) à 4,5mn de plasmolyse, et (H) à 10mn de plasmolyse.

(H) Les structures d'Hechtian sont visibles (curseur double), les lignes fluorescentes sont présentes avec les structures d'Hechtian et restent attachées à la paroi cellulaire durant la plasmolyse. Une tension excessive provoque la rupture de quelques tubules pendant la plasmolyse (curseur simple dans G).

(I) à (K) Immunolocalisation des sites à calreticulin dans les cellules exprimant la GFP:MP (immunofluorescence rouge).

(I) Les cellules sont orientées de telle sorte que la jonction cellulaire apparaisse en vue de face.

(J) Vue en coupe d'une jonction cellulaire en haute résolution.

Les astérisques indiquent les structures typiques à calréticulin au niveau des jonctions cellulaires. Les filaments fluorescents émergent de ces sites à calreticulin comme le laisse supposer la fluorescence jaune apparaissant sur la combinaison des 2 images (flèche double).

(K) Cellule induite sous contrôle dans laquelle l'anticorps anti-calreticulin n'a pas été ajouté.

Echelle = 5 µm sauf dans (D) et (E) (10 µm) et (J) (2 µm).

NB : Hechtian strands sont des structures qui ont été découvertes en 1912 par HECHT lors d'expériences de plasmolyse. Ce sont des structures membraneuses qui relient la membrane plasmique à la paroi cellulaire. Elles apparaissent lorsque la membrane plasmique se rétracte lors de la plasmolyse.

Cette planche présente des images obtenues en CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy).

Les images montrent bien la localisation des tubules au niveau des parois intercellulaires fusionnées. Les tubules apparaissent en vert puisqu'ils sont le résultat de l'assemblage de la GFP:MP (Green fluorescent Protein:Movement Protein). L'article indique aussi, comme nous le voyons sur les images, que jamais des tubules n'ont été observés au niveau de parois cellulaires non accolées mais toujours au niveau des parois séparant deux cellules adjacentes. Ceci supporte l'hypothèse de l'association aux plasmodesmes qui sont présents seulement au niveau des parois accolées.

Les images F à H montrent que les tubules sont liés à la paroi par leur base. Cette liaison qui comme nous l'avons vu se fait sur des sites spécifiques au niveau des plasmodesmes est forte puisque lors de la plasmolyse induite par l'ajout de Mannitol (lyse de la cellule par phénomènes osmotiques) les tubules ne sont pas décrochés de la paroi. Une tension trop forte peut provoquer leur rupture.

Les images I à K montrent la liaison des tubules aux sites à calreticulin. Ces sites apparaissent en rouge grâce à la fixation d'anticorps fluorescents anti-calreticulin. La présence de points jaunes indique clairement que le tubule émerge des sites à calreticulin (fluorescence rouge + verte = fluorescence jaune).

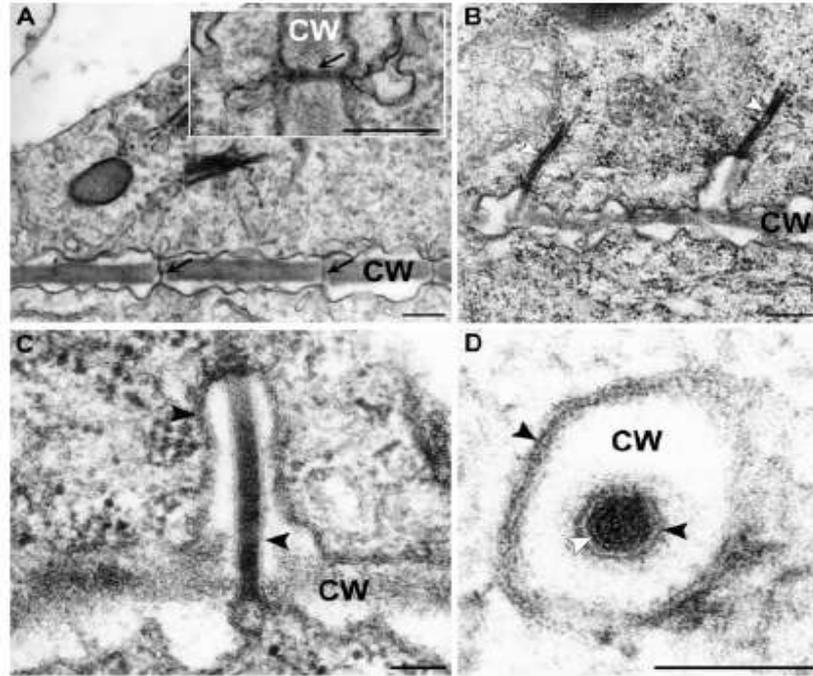


Figure 9 : Plasmodesmes et tubules de GFP:MP dans les jonctions cellulaires de cellules 2B15 avant et 24h après induction par la dexaméthasone (source : LAPORTE *et al.*, 2003)

(A) Avant induction. Plasmodesmes normaux (flèche) visibles dans les jonctions cellulaires des cellules non induites. L'encadré montre un plasmodesme à plus haute résolution.

(B) à (D) 24h après induction.

(B) Tubules polarisés associés aux jonctions cellulaires des cellules induites (curseur blanc). On peut noter les protubérances des jonctions cellulaires à la base des tubules.

(C) à (D) Vue détaillée d'un tubule en coupe longitudinale (C) et transversale (D). On peut noter la haute densité électronique du matériel remplissant la cavité centrale (curseur blanc) et la membrane plasmique délimitant l'extérieur des tubules (curseur noir).

Echelle : 500 nm except in (A) inset, (C), and (D) (200 nm)

La microscopie électronique permet ici de voir les jonctions cellulaires (cross walls) avant l'induction cellulaire par la dexaméthasone. Ceci n'était pas possible en CLSM puisque aucune fluorescence n'était détectée dans les cellules non induites. L'image A montre ainsi la structure normale d'un plasmodesme avant induction. Les images B et C montrent la modification très importante de la structure de la jonction intercellulaire reliée au tubule pour permettre le passage du virion dont le diamètre est au moins dix fois supérieur au diamètre du canal dans un plasmodesme normal.

D est une coupe transversale d'un tubule. La cavité centrale a une taille permettant le passage du virion.

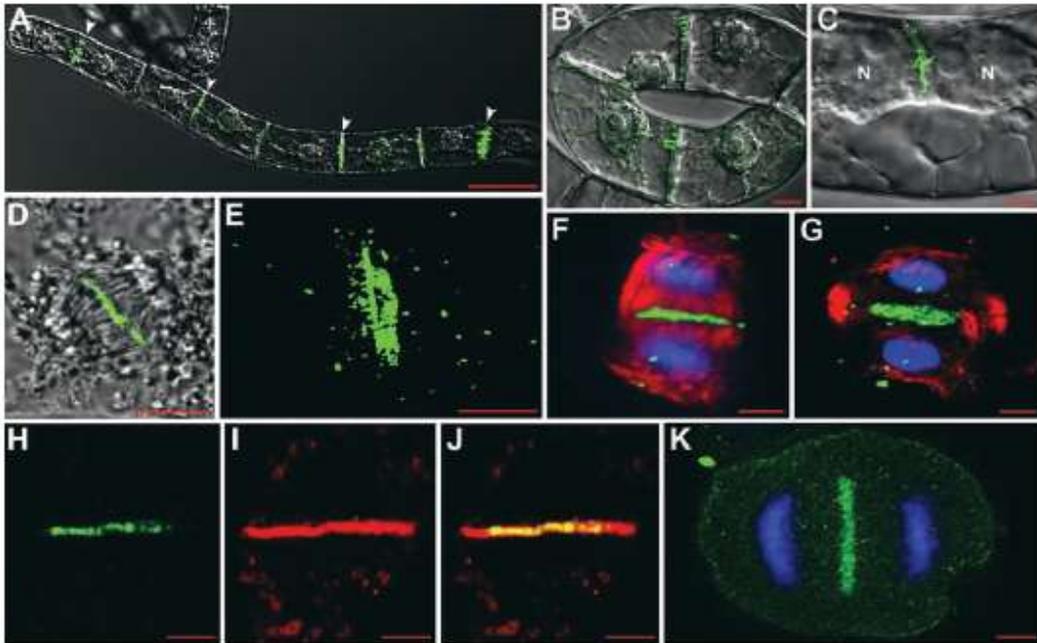


Figure 10 : Affinité préférentielle de la protéine GFP:MP pour les parois jeunes et pour la plaque cellulaire (source : LAPORTE *et al.*, 2003)

(A) Assemblage préférentiel des tubules au niveau d'une des 2 parois inter-cellulaires de cellules vivantes BY-2, 24h après induction (curseur blanc).

(B) et (C) Formation de tubules dans des cellules traitées à la caféine 24h après induction.

(B) Les tubules sont présents dans les parois inter-cellulaires les plus jeunes, dans une chaîne de 4 cellules n'ayant pas subi de division pendant le traitement à la caféine (cellules mononucléées).

(C) Les tubules se forment exclusivement au niveau du plan de division dans les cellules binucléées. La division a avorté dans ces cellules entrées en mitose durant le traitement à la caféine (N=noyau).

(D) Affinité de la GFP:MP pour la plaque cellulaire dans une cellule BY-2 en fin d'anaphase, 24h après induction.

(E) Projection tridimensionnelle de (D)

(F) et (G) projection tridimensionnelle montrant la GFP:MP (vert), microtubules (rouge), et les noyaux après coloration au 4,6-diamidino-2-phénylindole (bleu) dans des cellules immunomarquées en fin d'anaphase (F) et en fin de télophase (G).

(H) à (J) Colocalisation de la GFP:MP et KNOLLE dans le plan de division.

(H) à (I) Distribution de la GFP :MP (H) et immunomarquée de KNOLLE (I) dans une cellule en anaphase.

(J) Fusion d'images montrant la colocalisation partielle (signaux jaunes) de la GFP :MP et de KNOLLE au niveau de la plaque cellulaire.

(K) Immunomarquage de la MP dans des cellules BY-2 infectées par le GFLV, en fin d'anaphase. La MP (verte) s'accumule exclusivement au niveau de la plaque cellulaire qui se forme entre les 2 lots de chromosomes (bleus).

Cette planche permet d'illustrer la présence de la MP préférentiellement au niveau d'une des deux parois intercellulaire dans une chaîne polaire de cellules BY-2 (figure A). En règle générale les parois intercellulaires les plus proches de l'extrémité de la chaîne sont plus riches en tubules comme nous pouvons le voir sur l'image A. En considérant que les mitoses/cytokinèses (la cytokinèse est le processus commençant en fin d'anaphase qui permet la séparation du cytoplasme d'une cellule en deux cellules filles) interviennent de façon

synchrone dans toute la chaîne de cellules, l'équipe de Ritzenthaler en a conclu que les tubules s'assemblent préférentiellement au niveau des jonctions cellulaires des parois les plus jeunes. Ces observations suggèrent que la formation des tubules dans les parois intercellulaires est dépendante de la cytokinèse. En d'autres termes, l'initiation de la formation des tubules a lieu préférentiellement pendant la phase de maturation du phragmoplaste et moins fréquemment dans les parois intercellulaires préexistantes. Pour tester cette hypothèse des cellules ont été traitées avec de la caféine et observées en CLSM après induction. La caféine est connue pour inhiber le processus de maturation de la plaque cellulaire. La plaque cellulaire (cell plate) est la structure qui se forme au milieu des cellules des végétaux terrestres et qui permet la séparation d'une cellule en deux cellules filles lors de la cytokinèse. Elle est constituée de la fusion de multiples membranes provenant de vésicules du Golgi avec l'aide de synthaxines cytokinétiques. Cette fusion permet la création d'une nouvelle membrane plasmique pour chacune des deux cellules filles. La synthèse d'une nouvelle paroi cellulaire entre les deux cellules filles a également lieu au niveau de la plaque cellulaire (GU X. et VERMA D.P., 1997). Comme la caféine aboutit à la désintégration de cette plaque cellulaire incomplète sans interférer sur la progression du cycle cellulaire, deux types de cellules sont observés : des cellules normales (qui ne se sont pas divisées pendant le traitement) et des cellules binucléées qui sont la conséquence de l'interruption du processus de division. Dans les cellules normales, les tubules fluorescents se forment préférentiellement dans les parois intercellulaires les plus jeunes, comme le montre l'image B. Cette observation permet de conclure que la cytokinèse n'est pas un processus nécessaire pour la formation des tubules. Les tubules se sont également formés dans les cellules qui sont entrées en cytokinèse durant le traitement aboutissant à des cellules binucléées. Dans ces cellules, les tubules ne se sont pas formés à des sites aléatoires mais au niveau de la plaque cellulaire avortée (figure C).

Cette observation suppose que la GFP:MP et les composants de la plaque cellulaire subissent le même mode de transport.

Pour vérifier que la MP est transportée de façon similaire aux composants de la plaque cellulaire, des observations sont faites sur des cellules 2B15 durant la cytokinèse qui débute en fin d'anaphase avec la formation du phragmoplaste. Nous pouvons voir les tubules au niveau d'un plan médian de la cellule, correspondant probablement au plan de division, sur l'image D et E. Cette localisation au niveau de la plaque cellulaire a été confirmée en utilisant des Ac monoclonaux indiquant les microtubules du phragmoplaste et un antiserum de la synthaxine KNOLLE comme un marqueur de la plaque cellulaire.

L'image F et G montrent de façon évidente que la GFP:MP est présente au niveau du plan de division. Les images de H à J prouvent aussi que la GFP:MP est présente au niveau de ce plan de division en montrant clairement une colocalisation avec KNOLLE qui marque la plaque cellulaire (signal jaune en J = superposition des deux signaux : vert pour GFP:MP et rouge pour KNOLLE). L'image K présente le comportement de la MP dans un protoplaste BY-2 de la lignée sauvage. La localisation identique au niveau de la plaque cellulaire démontre que l'affinité de la MP pour la plaque cellulaire est une propriété intrinsèque de cette protéine et ne dépend pas de sa fusion avec la GFP. Cette image démontre aussi que ce phénomène est identique dans le contexte d'une infection virale normale.

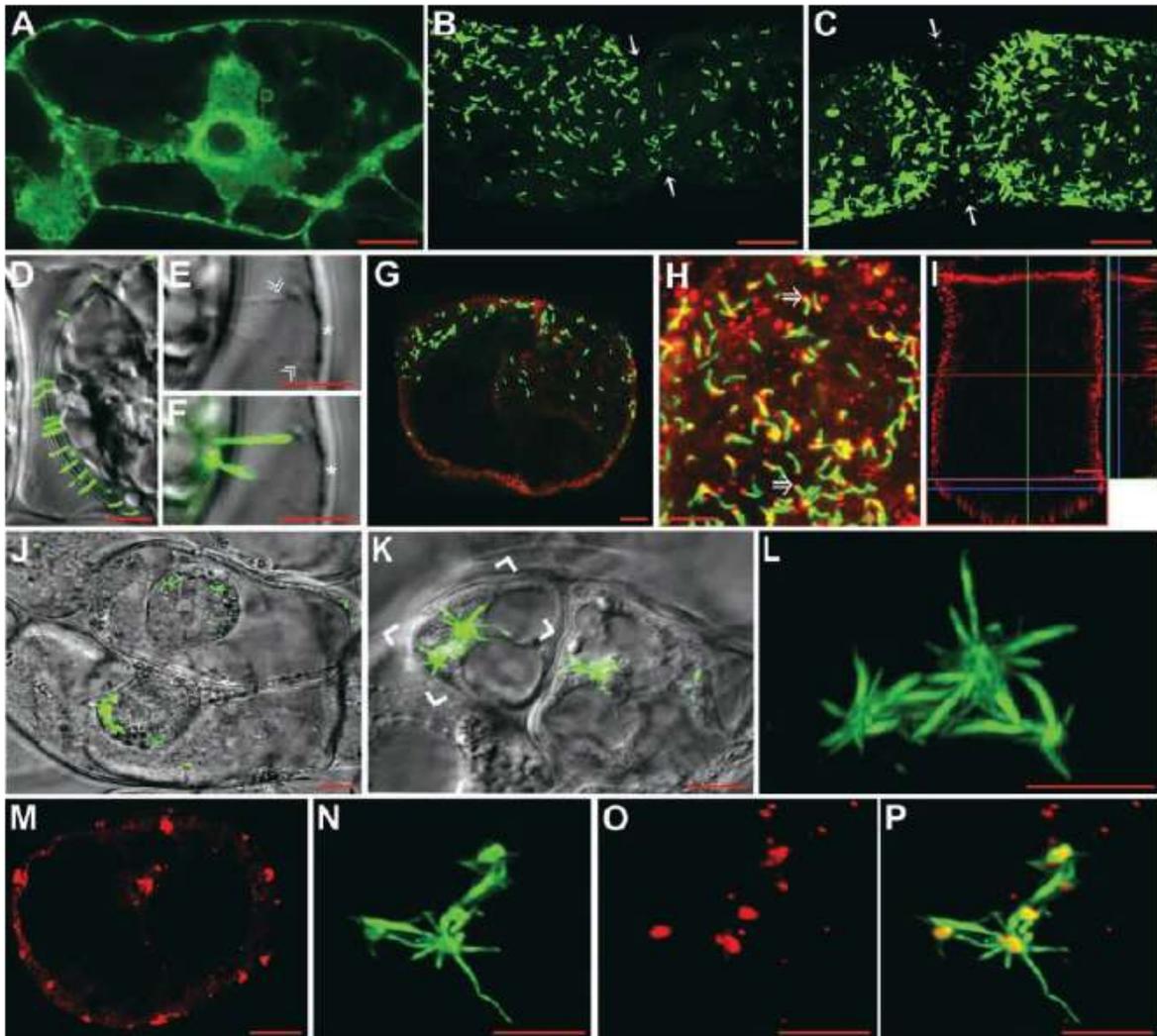


Figure 11 : Rôle du système endomembranaire et du cytosquelette dans l'adressage de la GFP:MP (source : LAPORTE *et al.*, 2003)

(A) Effet du BFA sur la distribution de la GFP:MP. Le BFA a été ajouté 8h après l'induction pour bloquer la voie sécrétoire. Les cellules sont observées 16h plus tard. La formation de tubule de GFP:MP est inhibée et la fluorescence est cytoplasmique.

(B) Effet de l'oryzaline sur la formation des tubules. Un total de 10M d'oryzaline a été ajouté 8h après l'induction, pour dépolymériser les microtubules. Les cellules ont été observées 40h après. Les tubules se sont formés sur la surface entière de la cellule au lieu d'être localisés spécifiquement au niveau de la paroi intercellulaire (flèche).

(C) à (F) Effet de la plasmolyse sur les tubules dans des cellules traitées à l'oryzaline. Les cellules ont été observées au moins 1h après l'addition de mannitol quand la membrane plasmique était rétractée de la paroi.

(C) Cellules traitées à l'oryzaline après plasmolyse. les tubules surgissent de la membrane plasmique et ne sont pas attachées à la paroi cellulaire.

(D) Les tubules se sont rétractés de la paroi avec le protoplaste durant la plasmolyse. Ils se dressent et sont reliés aux structures d'Hechtian connectées à la paroi intercellulaire ou à la paroi cellulaire.

(E) Image montrant les structures d'Hechtian (curseur double) connectées à la paroi cellulaire (astérisque).

(F) Les tubules sont présents avec les structures d'Hechtian. Il faut noter que les tubules ne sont pas rattachés aux parois (astérisque).

(G) Une cellule traitée à l'oryzaline, fixée avec du glutaraldéhyde et immunomarkée avec des anticorps à tubuline (rouge). Les microtubules sont complètement dpolymérisés (rouge) alors que les tubules formés par la GFP:MP (vert) sont visibles à la surface de la cellule.

(H) La distribution des tubules de GFP:MP (vert) et des structures à calreticuline (rouge) dans une cellule traitée à l'oryzaline. Les tubules se forment sur la surface entière de la cellule et la plupart émerge des sites à calreticuline (flèche double).

(I) Vue des structures à calreticuline dans 2 cellules BY-2 voisines de type sauvage. De nombreux sites à calreticuline sont présents sur la surface entière de la cellule.

(J) à (L) Effets de la dépolymérisation simultanée des microtubules et microfilaments sur la formation des tubules.

(J) Oryzaline et latrunculine ont été ajoutés 8h après induction pour dépolymériser les microtubules et les filaments d'actine. Les cellules ont été observées 40h après. Dans ces conditions, les tubules s'accumulent préférentiellement à la périphérie du noyau.

(K) Cellules contenant des tubules en forme d'étoile.

(L) Vue détaillée de la région d'intérêt dans (K)

(M) Structures à calreticuline dans une cellule traitée par oryzaline et latrunculine.

(N) à (P) Tubules en forme d'étoile (N) et agrégats cytoplasmiques de calreticuline (O) dans une cellule traitée par oryzaline et latrunculine. (P) montre une fusion des images correspondantes.

Le BFA est une drogue qui est connue pour inhiber la production des vésicules du Golgi et qui aboutit à la rupture de l'appareil de Golgi et à l'inhibition de la voie sécrétoire. Les images obtenues après traitement par cette drogue montrent une forte inhibition de la formation des tubules (image A).

D'un autre côté, le traitement des cellules avec des drogues spécifiques du cytosquelette n'interfère pas avec l'assemblage de la GFP:MP en tubules. L'administration, après induction, soit de latrunculine soit de cytochalasine (deux drogues entraînant la dépolymérisation des filaments d'actine), ou bien de taxol (molécule stabilisant les microtubules) n'altère pas le pourcentage de cellules présentant la formation de tubules. Dans

ces conditions, les tubules se forment préférentiellement dans les parois intercellulaires les plus jeunes.

Le traitement à l'oryzaline, une drogue qui provoque la dépolymérisation des microtubules et qui bloque le cycle cellulaire en métaphase, ne diminue pas significativement la formation des tubules. Par contre, le traitement à l'oryzaline induit une distribution intracellulaire totalement anormale des tubules. Au lieu de se former uniquement au niveau des membranes intercellulaires, on peut voir sur l'image B qu'ils sont présents au niveau de toute la surface membranaire de la cellule. Les images obtenues durant la plasmolyse montrent que les tubules ne restent pas accrochés à un point d'ancrage dans la paroi comme nous l'avons vu précédemment (images D à F).

Les traitements simultanés avec la latrunculine et l'oryzaline n'ont pas d'effets sur la formation des tubules (images J à L). Par contre, quand on réalise simultanément les deux traitements, les tubules ne sont plus localisés au niveau des parois, mais retrouvés dans le cytosol à proximité des noyaux et sont souvent organisés selon des structures en forme d'étoile (images K à L). La localisation des sites à calreticuline est très différente dans ces cellules doublement traitées (image M) comparée à celle des cellules non traitées (image I). En effet, les cellules traitées présentent une fluorescence en petits agrégats au niveau de la surface cellulaire et du cytosol, au lieu de points réguliers. Les images N à P montrent que les tubules formant des structures en étoiles prennent naissance au niveau des sites à calreticuline comme nous l'avons montré auparavant.

La conclusion de tous ces résultats vient appuyer les hypothèses faites au début de ce chapitre sur le comportement de la MP. En effet, ils prouvent que la formation de tubules dans les cellules BY-2 nécessite la présence d'un appareil sécrétoire fonctionnel, mais n'est pas dépendante du cytosquelette. Le bon adressage de la MP au niveau des membranes accolées de deux cellules est strictement dépendant des microtubules, alors que les microfilaments semblent être essentiels pour le transport de la MP vers la périphérie de la cellule lorsque les microtubules sont dépolymérisés. Ces résultats révèlent aussi que les sites d'assemblage de la MP en tubules (quelque soit l'endroit où ils sont formés en fonction des différents traitements) sont toujours corrélés avec la présence de sites à calreticuline, suggérant que l'assemblage des tubules nécessite un environnement spécifique pour être effectif.

Maintenant que nous avons détaillé les connaissances concernant les transports intra et intercellulaires ainsi que les sites d'assemblage de la protéine de mouvement, il nous faut faire le lien avec le mouvement de cellule à cellule du virion. Moins d'informations sont disponibles concernant le mouvement des particules virales que pour le transport de la MP.

Cependant, en se basant sur les très grandes similitudes entre la propagation du GFLV et du *Cowpea mosaic virus* (CPMV), un virus de la famille des *Comoviridae*, le mouvement de cellule à cellule du GFLV fait très probablement intervenir des interactions entre la MP et la CP ou bien, de façon moins précise, entre la MP et le virion durant les processus de transport intra et intercellulaire (ANDRET-LINK *et al.*, 2004). Ce mouvement à courte distance (d'une cellule à une cellule voisine) représente la première étape de l'infection systémique d'une plante entière.

Pour conclure, disons que les connaissances récemment acquises sur la protéine de mouvement sont très importantes à souligner puisqu'elles sont à la base de la recherche en géni-génétique pour obtenir des vignes résistant à une infection systémique par les virus du court-noué. Cette approche de la biologie du virus nous permettra de mieux comprendre les stratégies de lutte que nous détaillerons plus tard.

5 - Sérologie et structures des populations / Variabilité génétique d'isolats naturels.

Dans ce chapitre, nous allons être très concis puisque l'étude génétique des populations est une spécialité difficile à aborder et nécessitant des connaissances pointues dans le domaine. Il s'agit donc ici d'évaluer la stabilité génétique des populations du GFLV et de l'ArMV ainsi que des recombinaisons éventuelles afin de comparer les propriétés biologiques des différents isolats. Ceci consiste à observer une éventuelle extension de la gamme d'hôte, une modification dans la spécificité de transmission, une pathogénicité accrue par exemple. La fréquence des recombinaisons permet aussi d'investiguer les risques de la transgénèse et de les évaluer.

D'autre part, les connaissances des propriétés sérologiques des virus sont importantes pour certaines méthodes de dépistage de la maladie.

a - Sérologie

Les particules virales du GFLV et de l'ArMV sont de bons immunogènes. Le GFLV et l'ArMV sont des espèces virales homogènes sérologiquement (CABI et OEPP, 1995). Les tests réalisés à l'aide d'antisérums polyclonaux ou d'anticorps monoclonaux (HUSS *et al.*, 1987) révèlent une variabilité sérologique limitée. Cette stabilité permet d'utiliser en routine

les méthodes immunologiques (ELISA) pour le dépistage du court-noué (cf méthodes de dépistage).

De plus, sur la base d'antisérums polyclonaux toutes les souches de l'ArMV sont apparentées au GFLV. La parenté entre ces deux virus, pas seulement sérologique, a donné lieu à la supposition qu'ils auraient la même origine et même que le GFLV serait à l'origine de l'ArMV (HEWITT, 1985 ; NARAGHI-ARANI P. *et al.*, 2001). La découverte récente d'une capacité de protection croisée entre ces deux virus (HUSS *et al.*, 1989) conforte cette théorie.

b - Diversité génétique

Théoriquement, le GFLV a un grand potentiel de mutation puisqu'il infecte son hôte naturel sur de longues périodes (environ un an : cf cycle de vie des vecteurs) et que son processus de réplication est prédisposé aux erreurs. En effet, il n'y a pas de mécanisme de correction en cas d'incorporation d'une mauvaise base par la RNA-polymérase RNA-dépendante codée par le RNA1, à l'inverse de l'ADN polymérase qui travaille à répliquer notre génôme sans faire d'erreur pour former de nouvelles cellules. Ces prévisions théoriques s'avèrent exactes puisque plusieurs souches de virus sérologiquement liés ont été décrites dans le début des années 1980 (WALTER *et al.*, 1984 ; HUSS *et al.*, 1987). Des isolats du GFLV ou de l'ArMV provoquant différents symptômes sur feuilles ont été décrits sur de nombreuses variétés de vigne dans beaucoup de pays, comme nous l'avons vu dans la partie sur les symptômes. De la même façon, des isolats à l'origine de symptomatologies différentes ont été décrits sur des hôtes herbacés (HUSS *et al.*, 1989). Le niveau de variation génomique suggère qu'un isolat viral est une population de variants liés génétiquement, c'est-à-dire un groupe de virus ayant subi une ou plusieurs mutations semblables, appelé en anglais « a quasispecies » (FATOUCH S. *et al.*, 2005) (SCHNEIDER et ROOSSINCK, 2000). Ce sont NARAGHI-ARANI *et al.* (2001) qui ont démontré la nature de « quasispecies » des populations du GFLV en analysant 14 isolats provenant de 8 vignobles Californiens (NARAGHI-ARANI *et al.*, 2001). Plus récemment Emmanuelle VIGNE *et al.* ont travaillé sur la structure des populations de GFLV infectant naturellement deux sites plantés en Chardonnay dans la région Champenoise (VIGNE *et al.*, 2004). Cette étude portait sur 347 isolats de GFLV et a permis de mettre en évidence l'existence d'infections mixtes et de recombinaisons. La structure des populations et la diversité génétique ont été examinées à travers le gène de la CP par des analyses de IC-RT-PCR-RFLP (Immuno Capture-Reverse transcriptase-Polymérase Chaîne

Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) avec Eco R1 et Styl pour la structure des populations, et par séquençage des nucléotides pour la diversité génétique.

Très rapidement, expliquons le principe de la RFLP. Cette méthode consiste à couper le RNA viral préalablement amplifié par PCR avec des enzymes de restriction (EcoR1 et Styl). Ces enzymes reconnaissent des séquences bien définies et coupent l'ARN de façon parfaitement identique après reconnaissance de ces séquences. Les morceaux d'ARN obtenus après coupure par les enzymes de restriction forment ce que l'on appelle un restrictotype. La comparaison de ces différents fragments obtenus permet l'étude de la structure des populations du GFLV.

Les résultats des investigations menées par VIGNE *et al.* en 2004 sont très intéressants: 55% des 347 isolats testés ont une structure de population consistant en un restrictotype prédominant. A côté des résultats en RFLP, 85 des 347 isolats ont été séquencés. L'étude des séquences de 51 isolats représentant les différents restrictotypes a permis de confirmer l'existence d'infections mixtes avec une fréquence de 33%. Il a également été montré que deux haplotypes prédominants représentent 71% des séquences variantes (60 des 85) confirmant l'existence d'au moins deux haplotypes distincts dans cette population (VIGNE *et al.*, 2004). Les taux de variation rencontrés à l'échelle du nucléotide dans le gène CP s'étendent de 0,5% à 13,8%. Malgré cette grande variabilité, l'hétérogénéité à l'échelle de l'acide aminé est limitée (0,2 à 6,9%), indiquant une grande stabilité du gène de la CP du GFLV (VIGNE *et al.*, 2004a).

De plus, 5 isolats recombinants ont été identifiés sur les 347 analysés. Les propriétés biologiques des recombinants ont été examinées pour savoir si elles étaient semblables à celles des autres isolats et si les recombinants n'avaient pas de nouvelles caractéristiques comme des changements dans leur spécificité d'interaction avec *Xiphinema index*, une gamme d'hôtes élargie, ou une plus grande pathogénicité. Aucune différence significative dans la vigueur, l'expression des symptômes, ou l'incidence de la maladie n'a été détectée entre les vignes infectées par des isolats recombinants et non recombinants (VIGNE *et al.*, 2004 a).

D'autre part, l'étude que nous venons de détailler est également le premier rapport concernant l'évaluation des risques liés aux recombinaisons dans les vignes transgéniques exprimant le gène de la CP du GFLV. En effet, parmi les 347 isolats étudiés, 190 provenaient de vignes greffées sur des porte-greffes transgéniques (VIGNE *et al.*, 2004 b). Nous détaillerons plus loin les risques liés à la transgénèse (cf chapitre lutte) notamment grâce aux résultats de cette étude.

Après ces travaux de 2004, E. VIGNE a mené une autre étude, en 2005, sur un isolat recombinant naturel du GFLV, l'isolat A17b. Il paraît intéressant de dire quelques mots sur celui-ci, puisqu'il est très cité dans la littérature. Des passages en série sur *Gomphrena globosa* et *Chenopodium quinoa* (hôtes herbacés) ont été réalisés pour caractériser les propriétés biologiques de A17b. La séquence du gène de la CP dans lequel la recombinaison avait été détectée, est apparue stable après cinq ans dans son hôte naturel ainsi que dans *C. quinoa*. Comme pour l'étude de 2004, les propriétés biologiques de l'isolat A17b ne sont pas apparues modifiées dans son hôte naturel en comparaison aux isolats non recombinants, malgré une diminution de la sévérité des symptômes dans *C. amaranticolor*. Cependant, l'utilisation des transcrits chimériques du RNA2 de A17b en combinaison aux transcrits RNA1 de la souche F13 du GFLV (cf index), suggère que la recombinaison dans le gène de la CP de A17b n'est pas impliquée dans la diminution de la pathogénicité.

Très récemment, une autre étude de séquençage a été réalisée sur les isolats du GFLV rencontrés en Iran. La superposition des séquences montre plus de 99% d'homologie au sein des clones d'1 même isolat et 83 à 93% d'homologie entre les clones d'isolats différents. Ce travail confirme la nature de quasispecies des populations du GFLV en Iran (BASHIR N.S. *et al.*, 2007).

En ce qui concerne les souches de l'ArMV, malgré leur étroite similitude sérologique, elles peuvent différer (tout comme pour le GFLV) par l'expression des symptômes. Dans le cas de l'ArMV, les différentes souches peuvent également différer par leur gamme d'hôtes et leur transmissibilité par les nématodes (CABI et OEPP, 1995 ; TRUDGILL DL *et al.*, 1983). Des preuves sur les modifications des gammes d'hôtes ont été données dans plusieurs études. La souche houblon de l'ArMV (ArMV-H) est connue pour avoir une gamme d'hôtes très étroite en comparaison d'autres souches. Des preuves supplémentaires ont été données pour l'ArMV sur *Rubus* (John *et al.*, 1989). La transmissibilité par les nématodes diffère également d'un isolat à l'autre. Une étude écossaise a testé la transmission de deux souches anglaises de l'ArMV par des populations de *Xiphinema diversicaudatum* provenant de dix pays. Certaines populations de nématodes ne transmettaient pas l'une des deux souches de l'ArMV. Il a été mis en évidence que cette absence de transmission était observée pour les populations de nématode qui n'avaient pas été en contact avec le virus, mais qu'elles sont capables de devenir vecteur. Les taux de transmission se sont révélés différents en fonction de la population de vecteur, de la souche du virus, ou de la plante utilisée comme hôte du virus. Cette étude a montrée que les interactions plante-virus et virus-vecteur sont différentes en fonction des isolats viraux d'une part, et de leur vecteur d'autre part (BROWN D.J.F., 1986).

Enfin, et pour conclure sur la diversité génétique, citons une étude sur le séquençage des RNA2 d'isolats allemands du GFLV et de l'ArMV. Il a été trouvé des pourcentages d'analogie allant de 82 à 84% entre les isolats de l'ArMV (ArMV-NW, ArMV-L, et ArMV-U) ; 90% entre les deux isolats du GFLV (GFLV-NW et GFLV-F13) ; et 72% entre l'ArMV-NW et le GFLV-NW. Il est intéressant de noter que les plus grandes disparités de séquence d'acides aminés ont été trouvées entre les protéines 2A des différents isolats de l'ArMV, la protéine 2A de l'ArMV-NW montrant plus de similitude avec la protéine 2A du GFLV-NW qu'avec celle des autres isolats de l'ArMV. Les observations faites lors de ce travail soutiennent l'hypothèse que le GFLV serait à l'origine de l'ArMV.

C - Les vecteurs des virus du court-noué

Comme nous l'avons vu précédemment, les travaux de Hewitt *et al* ont permis de mettre en évidence la possibilité d'une transmission de certains phytovirus aux plantes par l'intermédiaire de nématodes ectoparasites. La transmission du GFLV par *X. index* a été la première mise en évidence de ce genre de transmission (HEWITT *et al.*, 1958). Rapidement, d'autres associations spécifiques virus-nématode ont été démontrées, notamment le rôle de *X. diversicaudatum* dans la transmission de l'ArMV par JHA et POSNETTE ainsi qu'HARRISON et CADMAN. Ces derniers transmettent les virus selon un mode semi-persistant non circulant et non multipliant. Un point important dans cette contamination est la spécificité élevée entre l'espèce de nématode et son virus associé. Cela est dû à la capacité du nématode à retenir le virus au niveau de sites spécifiques dans son appareil alimentaire.

Au cours des dernières années, les connaissances scientifiques concernant la biologie des *Nepovirus*, et en particulier celle du GFLV se sont considérablement étoffées. Associées à cela, le développement des techniques moléculaires a donné un nouvel élan à l'étude des interactions entre les *Nepovirus* et leurs vecteurs naturels, mettant en évidence l'implication de déterminants viraux dans la spécificité d'interaction. L'étude du modèle GFLV / *X. index* a montré que cette spécificité est déterminée uniquement par la protéine de capsid du virus (ANDRET-LINK P. *et al*, 2004 (a) et (b) ; ANDRET-LINK P., 2005).

De manière générale, il existe deux types de virus transmis par nématodes, à savoir, les virus à particules en bâtonnet et les virus à particules icosaédriques. Les virus à particules en bâtonnet, qui sont à symétrie hélicoïdale, appartiennent au genre *Tobravirus*, genre non rattaché à une famille. Ces virus sont transmis par des nématodes du genre *Trichodorus* ou

Paratrichodorus de la famille des *Trichoridae* appartenant à l'ordre des *Dorylaimida*. Les virus à particules icosaédriques sont les *Nepovirus* (famille *Comoviridae*). Ces virus sont transmis par des nématodes du genre *Longidorus*, *Paralongidorus* ou *Xiphinema*.

1 - Description des nématodes

Les trois genres *Longidorus*, *Paralongidorus* et *Xiphinema* transmettant les *Nepovirus* de la dégénérescence infectieuse et du dépérissement appartiennent à l'ordre des *Dorylaimida*, sous ordre *Dorylaimana* et à la famille des *Longidoridae*. Les vecteurs impliqués dans la transmission du court-noué appartiennent au genre *Xiphinema*. *Xiphinema index* transmet le GFLV alors que *Xiphinema diversicaudatum* transmet l'ArMV. Ces nématodes *Longidoridae* sont également appelés nématodes dagues (« dagger nematode ») par homologie de forme avec cette arme.

Les *Longidoridae* sont des vers mous, vermiformes à tous les stades. On n'observe pas de réelle différence morphologique entre les différents stades de développement si ce n'est la taille et quelques détails anatomiques peu apparents. Ce sont des nématodes de grande taille atteignant 300 à 1500µm de longueur et 15 à 35µm de diamètre au stade adulte.



Photo 60 : *Xiphinema index* (source : HYPPZ. INRA, 2008)

2 - Cycle de vie et alimentation

Le cycle de développement est ponctué de quatre stades larvaires (trois pour certaines espèces), chaque stade se terminant par une mue (RASKI *et al.*, 1983). En conditions naturelles, la majorité des espèces ont un cycle de vie très long (plus d'un an) alors qu'en serre, en conditions contrôlées, ce cycle de vie peut être réduit à quelques semaines. Le

premier stade larvaire se déroule généralement dans l'oeuf, la différenciation sexuelle se produit après la quatrième mue. Les femelles produisent des oeufs fertiles par parthénogénèse, hermaphrodisme ou reproduction sexuée. Pour 15 des 18 espèces vectrices de *Nepovirus*, la reproduction est parthénogénétique (parthénogénèse méiotique) et, lorsque c'est le cas, les mâles sont rares (DEMANGEAT G., 2007). Cependant, ces derniers existent et contribuent au brassage génétique de l'espèce. Au deuxième stade, le nématode se retrouve libre dans le sol et ne possède qu'une faible réserve d'énergie. Il est donc obligé de trouver une plante hôte à parasiter pour survivre. Dans le cas contraire, soit il meurt en quelques mois, soit il rentre en quiescence dans le sol où il peut rester ainsi plusieurs années, attendant le moment favorable à son développement pour se remettre en activité et terminer son cycle biologique. Le nématode peut également entrer en quiescence si les conditions climatiques sont défavorables (cf épidémiologie : études des temps de rétention du virus). Pendant le cycle de quiescence les fonctions biologiques sont arrêtées. Durant ces périodes, le nématode est sensible aux perturbations causées par le travail du sol, les variations de température ou d'humidité. Les données sur la durée du cycle de développement des *Xiphinema* sont très variables. Le cycle complet de l'oeuf à l'oeuf s'opère vraisemblablement en deux à trois mois dans les conditions les plus favorables (en pot à 25°C), et en sept à neuf mois, voire plusieurs années en conditions limites (ESMANJAUD D., 2000 ; DEMANGEAT G.*et al.*, 2005).

3 - Transmission

L'acquisition de particules virales par les nématodes est liée à leur comportement alimentaire. En effet, ces derniers sont pourvus d'un stylet creux leur permettant de ponctionner la nourriture dans les cellules de l'hôte. *Xiphinema* étant un ectoparasite, il vit dans la rhizosphère à proximité du système racinaire de la plante. La majorité de la population de nématode est retrouvée entre 30 et 80 cm de profondeur correspondant aux horizons les plus fortement colonisés par les racines (ESMANJAUD D. *et al.*, 1992). La longueur de son stylet (60 à 250µm) lui permet de pénétrer plusieurs couches de cellules et ainsi de se nourrir d'éléments nutritifs riches. Pour l'ensemble des *Longidoridae*, la morphologie de l'appareil alimentaire est semblable. Dans sa partie antérieure, le stylet est formé de l'odonstyle, partie la plus rigide, élaboré par une cellule situé dans la paroi de l'oesophage. Les larves en possèdent deux, le premier fonctionnel, le second est situé un peu plus bas dans l'oesophage. Ce dernier devient fonctionnel après la mue, quand le nématode perd son stylet en même temps que sa

cuticule. La partie postérieure du stylet est l'odontophore dont la partie basale est reliée aux muscles protracteurs permettant de faire sortir l'odontostyle. Après insertion de l'odontostyle, les *Xiphinema* absorbent le contenu de chaque cellule et progressent successivement dans les couches les plus profondes jusqu'à protrusion maximale de son stylet. Les nématodes ont développé de remarquables stratégies pour exploiter les extrémités des racines de leurs principaux hôtes. Ils se nourrissent préférentiellement sur les cellules indifférenciées, riche en cytoplasme, qu'ils reconnaissent par tactisme avec leurs lèvres. Après la perforation des cellules, le nematode déverse le contenu des glandes salivaires pour liquéfier le cytoplasme cellulaire et pouvoir ensuite ingérer les nutriments qui ne sont pas assimilables tels quels par le nématode. Ces opérations sont possibles grâce au bulbe basal des nématodes qui est un véritable organe de pompage (le bulbe basal est également appelé bulbe oesophagien ou bulbe musculoglandulaire en fonction des auteurs). Il est équipé d'un système complexe de conduits qui le relie aux glandes dorsales sécrétoires. Quelques secondes après l'insertion de l'odontostyle dans la cellule de plante, le bulbe se tend soudainement et les conduits deviennent distinctement dilatés. Ils se chargent des sécrétions de la glande salivaire dorsale. Ces conduits restent dilatés quelques secondes puis ils se rétrécissent de l'arrière vers l'avant, forçant la progression des sécrétions vers la cellule de plante perforée. Suit ensuite l'action de pompage du bulbe permettant l'ingestion alimentaire. Les périodes de contractions du bulbe sont interrompues par de courtes pauses durant lesquelles des sécrétions des glandes dorsales sont à nouveau propulsées dans la cellule de plante. Les sécrétions des glandes dorsales sont hautement destructives et liquéfient rapidement le cytoplasme et le nucléoplasme. Après 2 à 3 séries d'injections / absorptions, la cellule est presque vide. Son nucléole, toujours retenu par l'enveloppe nucléaire, n'est plus qu'un corps dense. L'odontostyle traverse ensuite la cellule vide et perce la paroi de la cellule suivante plus en profondeur. Peu à peu, les cellules vidées par le nématode nécrosent et meurent. Pour ne pas se priver rapidement de ressources nutritives en tuant les cellules au fur et à mesure des nombreuses périodes de prise alimentaire, les *Xiphinema* induisent la formation de grandes cellules hypertrophiées multinucléées à proximité des sites où il se nourrit, appelées cellules nourricières. Celles-ci sont obtenues par mitoses synchrones sans cytokynèse. Les mécanismes qui induisent la formation de ces cellules multinucléées, métaboliquement très actives, ne sont pas connus. Elles contiennent une quantité supérieure d'ADN, d'ARN et de protéines. Elles constituent la principale source alimentaire lors de la reproduction du nématode (ANDRET-LINK P., 2005). Ces cellules nourricières finissent tout de même par être tuées par la prise alimentaire du nématode mais à un taux beaucoup plus faible que les cellules méristématiques uninucléées.

C'est la prolifération de ces grandes cellules multinucléées qui provoque l'apparition de galles à l'extrémité des racines, comme nous l'avons décrit dans les symptômes de la maladie.

C'est pendant les étapes de la digestion que s'effectue la transmission ou l'acquisition du virus. Il faut noter que les quatre stades de développement de *X. index* ou *X. diversicaudatum* sont capables de transmettre les virus du court-noué. Les particules virales peuvent être acquises par un nématode à partir de racines infectées en un temps très court de l'ordre de 5 min. De façon similaire, la transmission des particules virales à la plante prend de 5 à 10 min lors des prises alimentaires, jusqu'à 15 minutes selon certaines sources (vectors of plant viruses, 2008). Nous verrons plus loin que les particules virales sont liées à la cuticule du nématode avec une grande spécificité. La dissociation virus-cuticule a probablement lieu au moment où les sécrétions glandulaires passent dans la plante (vectors of plant viruses, 2008).



Photo 61 : prise alimentaire de *X. index* par perforation d'une radicelle (source : NC state university)

Nous avons dit, en énumérant les dégâts provoqués par le court-noué, que les piqûres du nématode n'ont pas de conséquence sur la santé de la vigne (ESMENJAUD D. *et al.*, 1992). De façon plus générale, il semble qu'en France les quantités de nématodes trouvées par m³ de sol soit insuffisantes pour altérer la physiologie de la vigne. Par contre, dans des zones plus chaudes du bassin méditerranéen les effectifs de nématodes sont tels qu'ils pourraient avoir des effets néfastes directement par leurs piqûres. La formation des galles bloque la croissance des radicelles et engendre la formation de radicelles latérales. Elles ont un aspect

rabougri qui empêche l'exploitation des couches profondes. La plante devient donc plus sensible à la sécheresse. De plus, l'absorption des nutriments par les racines diminue (ESMENJAUD D., 2000). Pour illustrer cette hypothèse d'une nuisibilité directe, Guy BELAIR évalue approximativement que si le nématode n'est pas porteur de particules virales le seuil de nuisibilité se situe aux alentours de 500 nématodes pour 100cm³ de sol, alors que ce seuil est seulement de quelques nématodes pour 100cm³ si celui-ci est contaminé, puisqu'un seul individu virulifère sera suffisant pour transmettre le virus. Des dommages sur racines avec perte de vigueur et productivité ont été rapportés dans des vignobles australiens (Australian government, 2004) mais l'étude manque de précision et les critères de l'évaluation ne paraissent pas suffisamment rigoureux pour aboutir à un résultat probant. Quoiqu'il en soit, retenons que s'il y a un effet direct des piqûres des nématodes sur la santé du cep il n'est qu'anecdotique et négligeable par rapport aux dégâts engendrés par la virose.

En résumé, il y a trois étapes du processus alimentaire qui conditionnent la transmission du virus. Les particules virales sont ingérées par le nématode avec la nourriture, puis retenues spécifiquement au niveau de l'appareil alimentaire et, enfin, relâchées lors du flux des sécrétions produites par les glandes salivaires. L'efficacité de ces trois étapes, et en particulier celle de l'étape d'adsorption et de relargage des particules virales, détermine la capacité du nématode à être un vecteur efficace ou non des virus.

4 - Site de rétention des particules virales

Dans les nématodes vecteurs les particules virales sont adsorbées en des sites précis probablement en association avec un récepteur présent au niveau de la cuticule interne de l'appareil alimentaire. L'observation de coupes ultra-fines réalisées à partir de nématodes virulifères ont permis de montrer que, chez les *Longidorus* et sans doute les *Paralongidorus*, les particules virales sont présentes exclusivement dans l'odontostyle et entre l'odontostyle et la membrane guide (DEMANGEAT G., 2007 ; TAYLOR C.E. *et al.*, 1976).

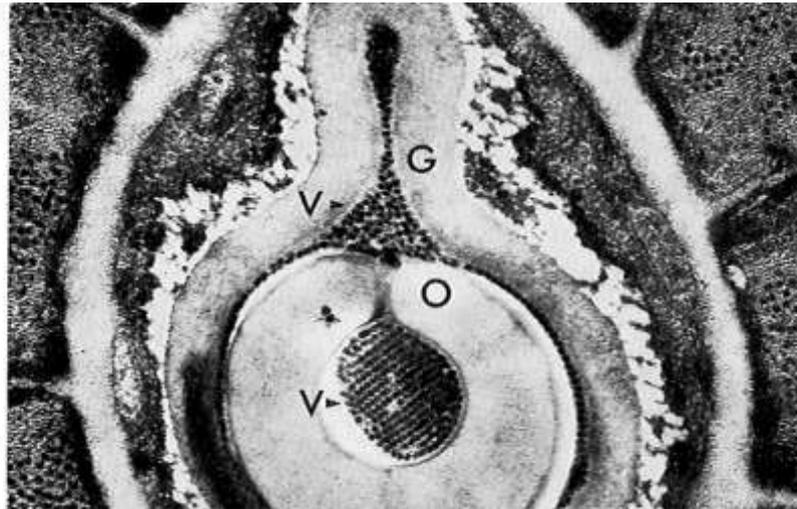


Figure 12 : coupe transverse au niveau de l'odontostyle de *Longidorus attenuatus* retenant des particules virales de l'AILV. (Source : TAYLOR C.-E. *et al.*, 1976).

Les particules virales (V) sont présentes entre l'odontostyle (O) et la membrane guide (G) ainsi qu'au niveau de la lumière de l'odontostyle.

Chez les *Xiphinema*, les particules virales se répartissent sur un segment de l'appareil alimentaire beaucoup plus long que chez les *Longidorus*. Elles sont adsorbées en une monocouche tapissant la cuticule de l'odontophore, de l'oesophage et du bulbe oesophagien mais surtout la partie antérieure de l'odontophore (TAYLOR C.E., ROBERTSON W.M., 1970) (cf figure 13). Les *Longidorus* et les *Xiphinema* diffèrent par leurs sites de rétention des particules virales. Cette différence de localisation et de surface de rétention explique probablement la différence du temps de conservation des particules virales entre les deux genres de nématodes. En effet, le temps de rétention des particules virales est beaucoup plus important chez les *Xiphinema* comparé aux *Longidorus*.

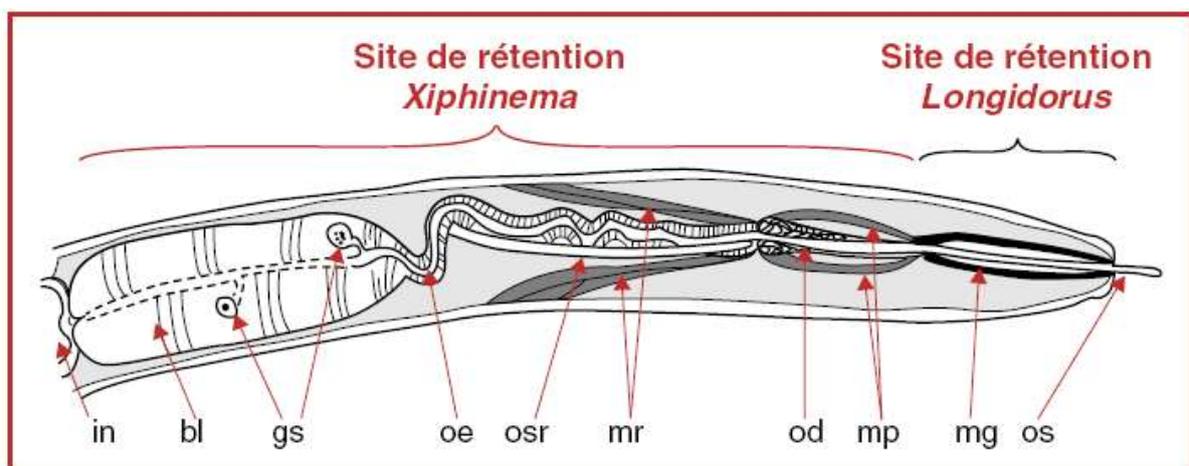


Figure 13 : Partie antérieure des *Longidoridae* (stade larvaire). (Source : DEMANGEAT G., 2007)

in : intestin ; bl : bulbe muscloglandulaire ; gs : glandes salivaires ; oe : oesophage ; osr : odontostyle de remplacement ; mr : muscle rétracteur ; od : odontophore ; mp : muscle protracteur ; mg : membraneguide ; Os : odontostyle. L'accolade noire indique la localisation des particules virales chez les *Longidorus* et l'accolade rouge celle chez les *Xiphinema* au niveau de l'appareil alimentaire du nématode.

A chaque mue, les particules virales sont éliminées car la cuticule qui recouvre le tractus alimentaire et l'odontophore est éliminée en même temps que l'odontostyle (figure 14). La cuticule et les particules virales sont ingérées ensemble à travers la valve oesophageo-intestinale (TAYLOR C.E., ROBERTSON W.M., 1970). Les nématodes ne sont plus virulifères après la mue et doivent se réalimenter sur une plante virosée pour devenir à nouveau porteurs du virus.

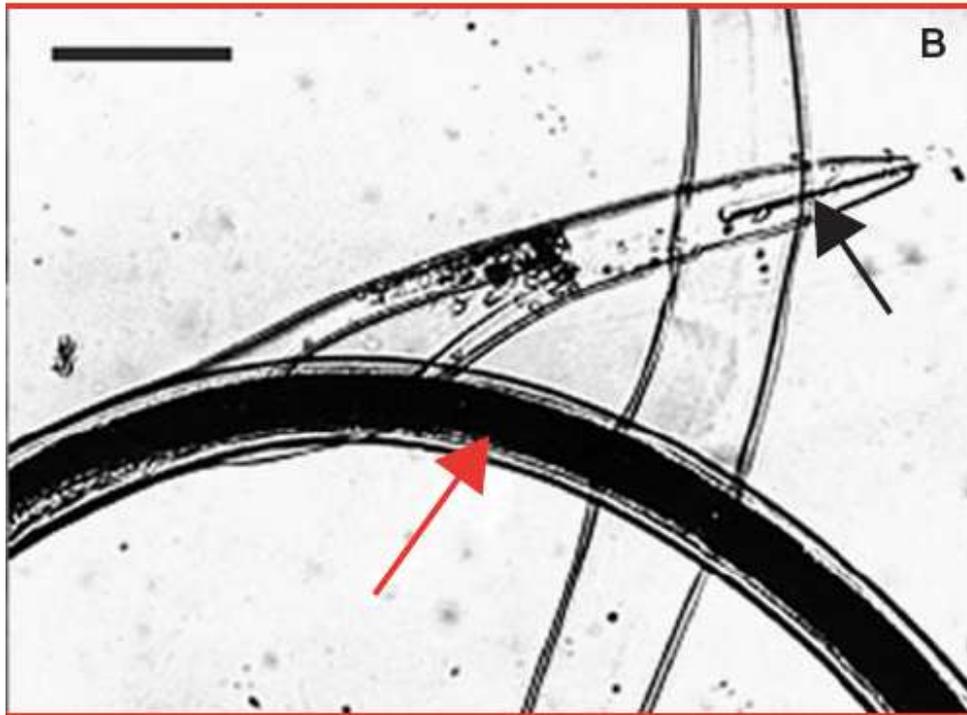


Figure 14 : Larve de *Xiphinema* en train de muer (Source : DEMANGEAT G., 2007)

La flèche rouge indique la larve néonate et la flèche noire indique la cuticule de mue à laquelle l'odontostyle est resté accroché. La barre représente 0,1 mm.

L'adsorption des virus est un phénomène spécifique et sélectif. L'incapacité des autres nématodes à transmettre des particules virales reflète probablement l'absence ou une nature différente des sites de rétention des particules virales. Depuis la découverte de HEWITT, RASKI et GOHEEN (1958) montrant que *X. index* était vecteur du GFLV, de très nombreuses combinaisons virus-nématode ont été rapportées. La plupart de ces associations n'ont pas été confirmées par d'autres travaux. Les résultats des expériences de plusieurs laboratoires ont montré des contradictions avec les modèles de spécificité de transmission proposés par HARISSON en 1964 (HARISSON B.D. 1964) pour le *Raspberry ringspot virus* (RpRSV) et le *Tomato black ring virus* (TBRV), deux autres *nepovirus* infectant la vigne transmis par *Longidorus elongatus* ou *Longidorus macrosoma* et *Longidorus elongatus* ou *Longidorus*

attenuatus respectivement. Il semblerait que d'autres espèces de nématodes que celle(s) spécifiquement associée(s) au virus en conditions naturelles puissent également être vecteurs. De tels résultats ont été obtenus avec le RpRSV-E (Raspberry ringspot virus – english strain) qui aurait été transmis en laboratoire par sept espèces différentes de nématodes *Longidoridae*. D'autre part, six espèces de ces nématodes ont été rapportées comme vecteurs de l'ARMV (TRUDGILL *et al.*, 1983). Ces constatations étaient basées sur l'observation de particules d'ARMV libres (non sélectivement liées) retrouvées dans la cavité buccale ainsi que dans l'intestin de *Longidorus elongatus* (TAYLOR et ROBERTSON, 1969) par TAYLOR et ROBERTSON. Ces derniers suggèrent donc que certaines transmissions peuvent résulter de la rétention non spécifique du virus. McNAMARA, en 1978, donne une autre explication des transmissions non spécifiques mises en évidence. Il suggère que dans les expériences de laboratoire, des contaminations du système racinaire des plantes testées peuvent avoir lieu par des virus venant soit de corps de nématodes pris dans les racines, soit d'excréments de nématodes adhérents aux racines. Il a fait cette démonstration en étudiant la possibilité de transmission du RpRSV-E par *X. diversicaudatum*, hypothèse soutenue par VALDEZ en 1972, alors que le vecteur naturel de ce virus est *Longidorus macrosoma* ou *elongatus*. Pour cette étude, aucune des plantes ne montrait d'infection systémique et tous les virus détectés venaient apparemment de contaminations externes des racines. Par opposition, il démontra qu'avec *L. macrosoma* beaucoup des plantes testées montraient une infection systémique. Il conclut que l'évidence de la transmission spécifique par un nématode n'est acceptable que si le virus transmis au niveau des racines donne une infection systémique. Il existe donc de nombreuses combinaisons virus-vecteur, auparavant mises en évidence, pour lesquelles la transmission est aujourd'hui considérée inadéquate. C'est par exemple le cas de l'ArMV et de *X. coxi* (FRITZSCHE, 1964), *L. caespiticola* (VALDEZ, 1972), *X. bakeri* (IWAKI KOMURO, 1974), *P. maximus* (McELROY *et al.*, 1976) ou encore *X. index* (FRITZSCHE et THIELE, 1979) (TRUDGILL *et al.*, 1983).

De la même façon *X. italiae* a également été proposé comme étant vecteur du GFLV (COHN E. *et al.*, 1970). Cependant cette association n'a jamais été confirmée par d'autres travaux (DEMANGEAT G., 2007 ; MARTELLI G.P. et BOUDON-PADIEU E., 2006 ; MARTELLI G.P., 1993). Il est donc fort peu probable qu'il puisse être un vecteur spécifique du GFLV. La transmission du GFLV par *X. vuittenezi* a également été suspectée mais pas prouvée (MARTELLI G.P., BOUDON-PADIEU E., 2006). Par conséquent, *X. index* est considéré comme étant le seul vecteur naturel du GFLV (DEMANGEAT G., 2007 ; MARTELLI G.P. et BOUDON-PADIEU E., 2006).

Par ailleurs, l'indication de l'existence d'un récepteur spécifique, au niveau de la cuticule de l'appareil alimentaire des *Xiphinema*, a été apportée par une expérimentation de génétique classique. Le croisement d'une population écossaise de *X. diversicaudatum* qui transmet efficacement l'ArMV avec une population italienne qui transmet faiblement l'ArMV génère des individus F1 dont l'efficacité de transmission est intermédiaire. Cette efficacité de la transmission de l'ArMV augmente avec la génération F2 mais n'atteint pas celle des parents écossais de départ (BROWN D.J.F., 1986). Le récepteur présent au niveau de la cuticule interne n'est pas connu. Néanmoins, chez *X. index* et *X. diversicaudatum*, la cuticule de l'odontophore et de l'oesophage peut être colorée à l'acide périodique. Cette coloration indique que ces zones sont tapissées de carbohydrates. Sachant que les particules virales ne sont immobilisées que dans ces zones, il a été proposé que ces carbohydrates pourraient interagir avec des structures à la surface des particules virales. Cependant, ce type de coloration n'a pas pu être mis en évidence chez les nématodes du genre *Longidorus*, ce qui suggère un autre mécanisme de rétention des particules virales pour ce genre.

Si on ne connaît pas encore les récepteurs présents sur la cuticule du vecteur, on sait par contre que la spécificité de l'interaction est déterminée par la protéine de capsid du virus (ANDRET-LINK P., 2005).

D - *Nepovirus*-nématodes : une interaction spécifique déterminée par la protéine de capsid du virus

Tous les nématodes phytophages ont la possibilité de transmettre ou d'acquérir des particules virales en s'alimentant sur leurs plantes hôtes. Il existe environ 3500 espèces de nématodes phytophages, dont 18 appartiennent aux genres *Longidorus*, *Paralongidorus* et *Xiphinema*. Il se trouve que 12 des 32 nepovirus connus à l'heure actuelle sont transmis par ces 3 genres. Ces chiffres soulèvent deux problématiques. La première est de comprendre pourquoi si peu de nématodes sont capables de transmettre des virus. La deuxième, est d'expliquer pourquoi seul un nombre limité d'espèces virales du genre nepovirus utilisent les nématodes comme vecteur naturel. Une des réponses à ces questions est l'existence de l'interaction très spécifique entre le vecteur et son virus associé. Dans ces quelques lignes, nous allons donner des exemples de spécificité d'association entre vecteurs et *Nepovirus* en

distinguant deux groupes de *Nepovirus* : les *Nepovirus* Européens (dont les *Nepovirus* du court-noué) que l'on associe à la dégénérescence infectieuse et les *Nepovirus* Américains responsables du dépérissement. Nous parlerons ensuite très brièvement des déterminants viraux impliqués dans la spécificité de la transmission des *Nepovirus*.

1 - Spécificité d'association.

Cette spécificité concerne principalement les *Longidoridae*, vecteurs présents en Europe. On ne retrouve pas de spécificité aussi forte pour le groupe des *Nepovirus* nord-américains et leurs vecteurs associés. Elle est complexe et se situe à différents niveaux (tableau dans partie I). En effet, certains *Nepovirus* sont associés à une espèce définie de nématode. C'est le cas par exemple de *L. apulus* qui transmet l'AILV ou encore de *X. index* qui transmet le GFLV. Cependant une espèce de nématode peut transmettre plus d'un virus. Ainsi, *X. diversicaudatum* peut transmettre l'ArMV et le SLRV alors que *L. elongatus* est le vecteur du raspberry ringspot virus (RpRSV) et du TBRV (cf tableau partie I). Les observations de terrain ont également montré que deux népovirus proches mais sérologiquement distincts peuvent être transmis par deux nématodes différents appartenant au même genre. Ainsi, les virus formant le complexe du court-noué (GFLV et ArMV) qui, comme nous le savons sont très proches, sont transmis par *X. index* et *X. diversicaudatum* respectivement. Il en est de même des isolats écossais et anglais du RpRSV qui sont transmis spécifiquement par *L. elongatus* et *L. macrosoma* respectivement bien qu'ils possèdent des propriétés antigéniques communes. Cependant, quand deux variants d'un même virus ne présentent que de très faibles différences sérologiques entre eux, ils sont généralement transmis par le même vecteur. Ainsi, *L. elongatus* transmet efficacement la souche écossaise du RpRSV ainsi que deux autres variants de ce même virus. L'isolement géographique de certaines associations conduit quelquefois à un très fort niveau de spécificité. Ceci peut être illustré avec le cas du SLRV dont un isolat italien ne peut être transmis que par une population locale de *X. diversicaudatum*. Nous avons déjà mis en évidence ce degré de spécificité extrême dans la partie sur la diversité génétique avec l'étude de DJF BROWN de 1986 qui étudiait la capacité de transmission de souches anglaises de l'ArMV par des *X. diversicaudatum* provenant de dix pays différents. Cette étude montrait une absence de transmission dans certains cas, pour lesquels il n'y avait jamais eu de contact entre le virus et le vecteur.

Sur le continent nord-américain, la principale espèce vectrice de virus est le groupe des *X. americanum*. La classification dans ce groupe reste encore très controversée (vectors of plant viruses, 2008). En effet, l'avis général actuel porte à plus de 40 le nombre d'espèces appartenant à ce groupe. La totalité du complexe d'espèces est inclus dans le groupe *Xiphinema americanum sensu lato* dans lequel des différences morphologiques entre les espèces sont mineures et peu de taxonomistes sont capables de les différencier (DEMANGEAT, 2007). L'une des espèces de ce groupe est *X. americanum sensu stricto* pour laquelle il y a une identification claire. Le groupe contient également *X. pachtaicum* et *X. brevicolle* qui semblent être bien identifiés. Plusieurs espèces de *X. americanum* transmettent indifféremment deux, trois ou quatre virus différents. Même s'il existe des spécificités de transmission entre certains virus et certaines populations, cela concerne des populations et des isolats très localisés. Prenons pour exemple le Tomato ringspot virus (ToRSV), l'un des quatre *Nepovirus* américains (cf partie I) qui possède deux souches sérologiquement distinguables. La souche type (« type strain »), provoquant le syndrome nommé « decline » par les américains, est transmise par *X. americanum sensu stricto* et *X. rivesi*. L'autre souche de ce virus, la souche californienne (« californian strain »), provoque un syndrome nommé « yellow vein », se rapprochant de la panachure pour les *Nepovirus* européens, est transmis par *X. californicum*. Il semble donc que la spécificité d'association entre les *Nepovirus* américains et leurs vecteurs soit plus complexe que celle observée pour les vecteurs des *Nepovirus* européens.

Pour qualifier la nature des associations entre virus et vecteurs, BROWN et WEISHER ont proposé le concept d'association « exclusive » et « complémentaire ». D'après ce concept, l'exclusivité correspond aux situations où une espèce de nématode transmet un virus ou une souche virale sérologiquement caractérisée. Réciproquement, ce virus ou cette souche virale n'est transmise que par un seul vecteur. L'exclusivité concerne sept associations virus-vecteurs (DEMANGEAT, 2007) dont GFLV/*X.index*. La complémentarité, qui concerne le reste des associations, est définie pour les situations où une espèce de nématode peut transmettre plusieurs virus ou souches de virus sérologiquement distinctes. C'est le cas de *X. diversicaudatum* qui transmet l'ArMV et le SLRSV.

2 - Les déterminants viraux impliqués dans la spécificité de la transmission des népovirus. Exemple du GFLV

Dans les années 60 à 70, les travaux menés par Brian HARRISON et ses collègues sur les souches S (Scottish) et E (English) du Raspberry Ringspot virus (RpRSV) ont montré que la souche S est transmise par le nématode *Longidorus elongatus* tandis que la souche E est transmise par le nématode *Longidorus microsoma*. Des pseudo-recombinants ont été construits à partir de ces deux souches. Différentes combinaisons ARN1/ARN2 ont été obtenues et leur transmissibilité par *Longidorus elongatus* a été testée (HARRISON B.D., 1964). Ces travaux ont permis de montrer que les isolats contenant l'ARN2 de la souche S sont plus fréquemment transmis que ceux contenant l'ARN2 de la souche E. De même, les travaux menés sur les sérotypes beet ringspot (transmis par *Longidorus elongatus*) et potato bouquet (transmis par *Longidorus attenuatus*) du Tomato blackring virus (TBRV) ont montré que le pseudo-recombinant contenant l'ARN1 du sérotype potato bouquet et l'ARN2 du sérotype beet ringspot est transmis par le nématode *Longidorus elongatus*. En conclusion, l'analyse de la transmissibilité des isolats pseudo-recombinants du RpRSV et du TBRV, a permis de montrer que les déterminants viraux impliqués dans la transmission sont codés par l'ARN2 (ANDRET-LINK P., 2005).

Il a fallu poursuivre les études de HARRISON pour comprendre l'implication des protéines codées par le RNA2 (2A^{HP}, 2B^{MP}, 2C^{CP}) dans cette spécificité de transmission. Pour cela, BELIN et ses collègues ont mené des expériences de génétique inverse que nous avons déjà citées pour comprendre le rôle des protéines de l'ARN2 dans le mouvement du virus. Ces mêmes expériences visant à obtenir des ARN chimériques entre le GFLV et l'ArMV (voir mouvement du virus) ont également permis de démontrer que seule la protéine 2CCP et 9 acides aminés C-terminaux de la protéine 2BMP sont impliqués dans la spécificité de la transmission entre le GFLV et l'ArMV.

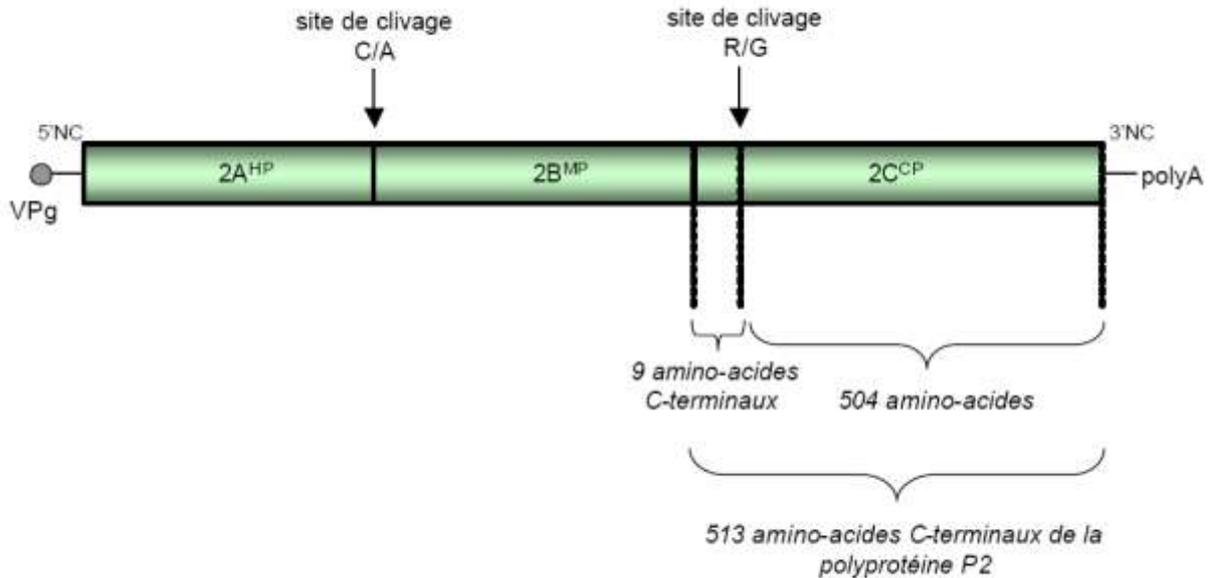


Figure 15 : acides aminés responsables de la spécificité de transmission (Polyprotéine P2) (source : ANDRET-LINK P., 2005)

P. ANDRET-LINK a ensuite poursuivi ce travail au cours de sa thèse dont le but était d'identifier les aminoacides responsables de cette spécificité au niveau des 513 résidus C-terminaux de la polyprotéine P2. BELIN avait montré que si les 9 AA C-terminaux n'étaient pas de la même origine virale que le gène de la 2CCP il n'y avait pas d'infection systémique. Il avait donc été supposé qu'ils pouvaient faire partie des déterminants viraux de la spécificité d'interaction. L'analyse de P. ANDRET-LINK a permis d'exclure un rôle pour ces 9 AA C-terminaux de la 2BMP, ceux-ci étant impliqués dans la maturation de la protéine P2 et son clivage au niveau du site R/G. Ils sont donc indispensables puisqu'ils conditionnent la bonne maturation de l'ARN2 conduisant à une protéine 2CCP fonctionnelle mais ils ne sont pas des déterminants viraux dans l'interaction virus-vecteur. La protéine de capsid est donc le seul déterminant viral de la spécificité de transmission du GFLV par *X. index* (ANDRET-LINK P. *et al*, 2003). Cela constitue la première preuve moléculaire de l'implication de la capsid dans le mécanisme de la transmission.

La recherche des déterminants viraux de la spécificité de vexion du GFLV s'est donc poursuivie au niveau de la protéine de capsid, notamment grâce à l'élaboration et l'analyse d'un modèle 3D de la capsid du GFLV. Cette structure a été obtenue en utilisant la technique de modélisation par homologie qui a permis de rapprocher la structure de la particule virale du GFLV avec celle du TRSV. Nous avons présenté plus haut une structure tridimensionnelle de la capsid du TRSV avec les 3 domaines A, B et C correspondant aux 3 domaines (feuillet β)

de la 2CCP. Il est ensuite possible de caractériser quels AA se trouvent sur la face interne de la capside ou sur la face externe. Il a été admis que les AA concernés dans l'interaction avec le vecteur devaient se situer sur la surface externe de la capside pour pouvoir entrer en contact avec le tractus oesophagien du nématode. Pour déterminer quels étaient ces AA, P. ANDRET-LINK et ses collègues se sont basés sur un principe simple. Ils ont considérés que les AA concernés étaient théoriquement conservés parmi les isolats de GFLV transmis par *X. index* et absents des protéines 2CCP de virus non transmis par *X. index*, y compris l'ArMV. En croisant les données concernant la structure 3D de la capside et les alignements de séquences de plusieurs virus et isolats viraux, ils ont pu mettre en évidence 3 zones d'intérêt situées dans le domaine B de la protéine de capside. Dans sa thèse P. ANDRET-LINK propose un schéma de la structure de la 2CCP montrant les zones interagissant avec la cuticule interne du nématode (figure 16). Ces mêmes zones sont représentées sur le modèle de la capside du GFLV dans un diaporama présenté par M. FUCHS au dixième séminaire de la CRECEP (figure 16).

Domaine A ■ Domaine B ■ Domaine C ■
 En jaune, les zones cibles de la spécificité de transmission ●

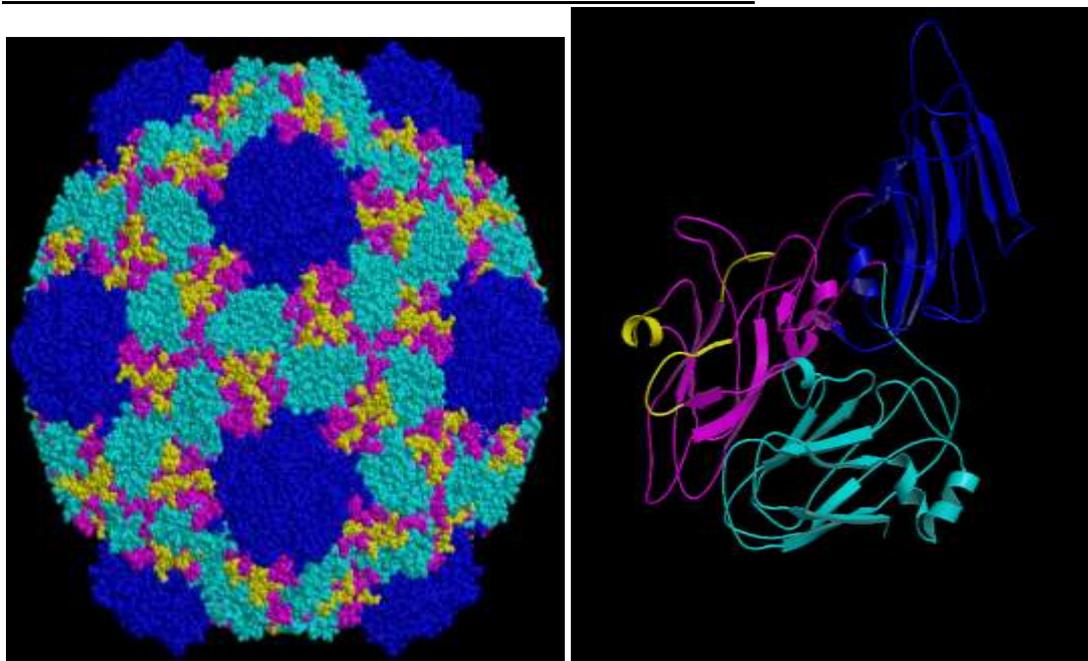


Figure 16 : A gauche : modèle 3D de la capside du GFLV (FUCHS M, 2003). A droite : Schéma de la structure de la 2CCP (ANDRET-LINK P., 2005).

Dans cette partie sur la biologie du court-noué, nous avons détaillé les symptômes et les dégâts provoqués par cette maladie et évoqué rapidement les viroses induites par les autres

Nepovirus européens ou américains provoquant, tout comme le court-noué, les syndrômes de dégénérescence infectieuse ou de dépérissement. Les connaissances concernant ces maladies virales sont en pleine extension et la biologie des virus est maintenant assez bien connue, même s'il reste de nombreux points à éclaircir. Du côté des vecteurs, si l'on exclut le groupe des *X. americanum*, leur morphologie, leur comportement alimentaire et leur gamme d'hôtes sont bien connus. Comme nous venons de le voir, une des principales caractéristiques dans ce pathosystème est la spécificité élevée qui lie le vecteur et le virus. Un autre point remarquable de ces associations virus-vecteurs est la longévité de l'interaction entre les nématodes du groupe *Xiphinema* et leurs virus associés, résultant de la capacité du nématode à entrer en quiescence.

Au cours des dernières années, le développement des techniques moléculaires a également apporté de nouveaux outils permettant de différencier les principales espèces de nématode vecteur de virus parmi les populations non vectrices de virus. Ces outils sont sensibles et reproductibles et permettent de définir le potentiel infectieux des sols entre deux cultures et d'expliquer l'inefficacité des méthodes de lutte actuelles contre la maladie du court-noué et, de la même façon, contre les principales maladies à virus transmises par nématodes. Les techniques de détection du virus au sein de la plante, dans les différents organes, se sont également multipliées et sont maintenant, pour certaines d'entre elles, utilisables en routine dans des laboratoires de proximité.

Tout cela permet d'étudier de façon de plus en plus approfondie l'épidémiologie de cette maladie à l'origine de pertes économiques considérables, dans le but de mettre au point de nouvelles stratégies de lutte comme le développement de plantes résistantes au virus et/ou aux nématodes. Cette nouvelle approche génétique semble aujourd'hui être la seule solution efficace et durable mais elle ne doit pas pour autant entraver les efforts mis en oeuvre au niveau de la sélection sanitaire des plants destinés à être replantés ou greffés. Au contraire, les normes encadrant la sélection sanitaire des plants de vigne, même si elles diffèrent entre les différentes régions du monde, sont de plus en plus précises et doivent absolument être appliquées comme il se doit par tous les pays importateurs ou exportateurs de matériel végétal destiné à la plantation ou au greffage.

Ce sont ces différents points que nous allons maintenant abordés dans cette thèse.

III –
EPIDEMIOLOGIE,
DEPISTAGE ET
METHODE DE
LUTTE

A – Epidémiologie

Le court-noué de la vigne est, de part son importance économique, la première virose sur vigne dans le monde. Elle est également placée au premier rang en France. Concernant les vignobles français, les délégations régionales de l'ONIVINS (Office National Interprofessionnel des VINS), avec l'aide des structures locales (Chambres d'agriculture, interprofessions), ont estimé la présence du court-noué au vignoble, en distinguant la prévalence de la maladie selon trois classes de gravité (DEMANGEAT G. et al., 2005 (c)) :

- vignoble avec pratiquement pas de court-noué : plantation avec du matériel certifié en terrain neuf ou reposé,
- vignoble peu affecté : le taux d'infection est non nul, mais la mise en place de mesures prophylactiques (dévitalisation, repos du sol de 2 à 3 ans) est de nature à permettre une replantation sans risque agronomique majeur,
- vignoble très touché, pour lequel une replantation sans désinfection ou repos prolongé du sol (10 à 12 ans), conduit à une présence du court-noué à un taux et à un risque qui compromettent la viabilité économique.

Les résultats de ces enquêtes épidémiologiques sont les suivants :

- 1/3 du vignoble français avec pratiquement pas de court-noué
- 1/3 du vignoble peu affecté par le court-noué
- 1/3 du vignoble très touché par le court-noué.

Ces situations sont très variables selon les vignobles. Ceux avec peu de court-noué sont ceux d'Alsace, Bourgogne, Champagne, Côtes de Provence, Charente, Corse, Armagnac et Val de Loire. Les vignobles très touchés par le court-noué sont ceux de Beaujolais, Côtes du Rhône septentrionales, Jura-Savoie, Languedoc-Roussillon, Cahors. Cependant, ces données sont très générales et l'incidence de la maladie au sein d'une région varie beaucoup notamment avec l'âge du vignoble. Ainsi, dans les zones AOC septentrionales, il faut noter le contraste entre une partie du noyau ancien, très contaminé, et l'extension par plantations récentes sur terrain neuf qui ne se trouve pratiquement pas concernée (cas de Champagne, Chablis, Maconnais, Sancerre...).

La dissémination de l'ArMV et du GFLV dépend de deux types de propagation : soit par le matériel de propagation, soit par leurs nématodes vecteurs.

Les virus sont transmis par les nématodes à stylet selon les modalités que nous venons de détailler. Ce mode de transmission naturel ne permet que la dissémination du virus à petite échelle, sur des distances très courtes, étant donné la faible mobilité des nématodes. Cette dissémination est lente et provoque l'apparition de taches appelées foyers de court-noué. Le temps de survie des nématodes vecteurs en l'absence de vigne conditionne les temps d'attente pour la replantation des parcelles après destruction d'une vigne virosée. Ce temps de survie dépend de nombreux facteurs pédo-climatiques, mais aussi de la gamme d'hôtes des nématodes. En effet, *X. index* et *X. diversicaudatum* peuvent se nourrir sur d'autres plantes, constituant ainsi un réservoir de vecteur. L'épidémiologie du court-noué doit également tenir compte des gammes d'hôtes des virus et envisager de ce fait la présence de réservoirs d'inoculum.

Les mouvements à grande échelle, à travers le monde, résultent de la transmission par le matériel de propagation, c'est-à-dire les boutures de greffons ou de porte-greffes. Cette transmission par du matériel végétal infecté est contrôlée grâce à la mise en place de schémas de certification sanitaire des plants destinés à la plantation, ainsi que par l'existence de mesures réglementaires pour l'implantation des parcelles mères devant servir à la confection de matériel de base ou de matériel certifié.

D'autre part, au laboratoire, le GFLV et l'ArMV peuvent être transmis par inoculation mécanique à partir de tissus de vigne à des plantes herbacées telles que *Chenopodium quinoa* et *Chenopodium amaranticolor* qui sont les deux espèces principales sur lesquelles ce type d'opération est réalisé. Ces transmissions sont mises en oeuvre dans un but diagnostic et sont des étapes obligatoires dans la sélection sanitaire. Les graines de *C. quinoa* et *C. amaranticolor* peuvent transmettre le virus à la descendance. La transmission par les graines de vigne est controversée (WALTER B. et al., 2000).

1 - Transmission par les nématodes à stylet

a - Répartition géographique de *X. index* et *diversicaudatum*. Exemple du territoire français.

X. index est présent dans la quasi totalité du vignoble français et sa répartition se superpose bien avec celle des foyers de court-noué existant comme le montre une étude d'échantillonnage très précise menée dans 9 des plus grands châteaux du bordelais (DELEMARRE F., 2005). Peu de vignobles semblent avoir été épargnés par la dissémination passive de cette espèce par le biais du matériel végétal infecté utilisé lors de plantations : les nématodes se trouvent dans la terre entourant les pieds de vigne (FIOLLEAU V. 2004). *X. index* est très fréquent en Provence, Languedoc-Roussillon et dans la Basse et la Moyenne Vallée du Rhône, pour les vignobles méridionaux. En Corse, seuls quelques points de contamination ont été identifiés mais la prospection a été relativement limitée. En Bourgogne, Champagne et Alsace, sa présence, fréquente, est probablement sous-évaluée. L'espèce est également présente dans les vignobles du sud-ouest, de Cognac, ainsi que dans la vallée de la Loire et le vignoble du Jura (DEMANGEAT G. *et al.*, 2005 (c)).

X. diversicaudatum était vraisemblablement endémique, à l'origine, dans la moitié nord de la France. Néanmoins, il est probable que la vigne ait participé à sa dissémination passive dans la plupart des vignobles septentrionaux ainsi que dans les régions les plus méridionales. Bien que la prospection concernant ce vecteur soit plus limitée, cette espèce a été retrouvée en Alsace, Bourgogne, Champagne ainsi que dans les vignobles de Cognac et du Bordelais (ESMANJAUD D., 2000).

b - gamme d'hôtes des nématodes vecteurs et des virus du complexe

Les deux virus du complexe, malgré qu'ils soient très proches structurellement et quasi indifférentiables par les symptômes qu'ils provoquent, ont une gamme d'hôte totalement différente. Le GFLV est un virus inféodé à la vigne. C'est à l'heure actuelle son seul hôte naturel connu. Le GFLV a cependant été décrit, en infection naturelle, sur les espèces suivantes : *Aristolochia clematitis*, *Lagenaria siceraria turbinata* (HORVATH *et al.*, 1994), *Brassica geniculata*, *Sonchus oleraceus* (JIMENEZ, 1980). Ces infections ont un caractère

anecdotique et, par conséquent, les plantes ici citées ne sont pas considérées comme des hôtes à proprement parler. En revanche, l'ArMV peut infecter diverses espèces cultivées ou adventices qui constituent alors une réserve de virus.

Tout comme l'ArMV par rapport au GFLV, *X. diversicaudatum* a une gamme d'hôtes beaucoup plus large que *X. index*. En effet, en conditions naturelles *X. index* est principalement inféodé à la vigne et présente peu d'autres plantes hôtes, c'est-à-dire des plantes capables de favoriser sa multiplication. Le figuier est l'une d'entre elles, et paraît être un hôte de bonne qualité pour ce nématode (FIOLLEAU V., 2004). Cependant, sa répartition est exclusivement méditerranéenne ce qui limite son impact à l'échelle du territoire français, d'autant plus que le figuier n'est pas hôte du virus. Daniel ESMANJAUD, spécialiste de l'étude des populations de nématodes, rescence deux autres hôtes principaux pour *X. index* : le jasmin et le peuplier (ESMENJAUD D., 2000). Les autres hôtes sont beaucoup plus anecdotiques et ne permettent pas au nématode de se multiplier de façon importante (cf tableau).

Xiphinema diversicaudatum, à l'inverse, est très polyphage et peut infester de nombreuses espèces pérennes (arbres fruitiers, petits fruits, arbres et ornementaux...) et annuelles (cultures légumières, adventices) (cf tableau). De plus, il transmet l'ArMV à la plupart des plantes hôtes (ESMANJAUD D., 2000) (tableau 3). Certainement en relation avec sa grande polyphagie, *X. diversicaudatum* est également capable de transmettre un autre virus que l'ArMV, le Strawberry latent ringspot virus (SLRSV). Le SLRSV est un autre népovirus infectant la vigne (cf tableau partie I) ainsi que d'autres plantes dont le fraisier, comme son nom l'indique. Ce virus n'a pas été retrouvé en France à l'heure actuelle ; il est endémique en Allemagne, Italie, Portugal, Tchécoslovaquie et Turquie (WALTER B., 2000).

	<i>X. index</i>	<i>X. diversicaudatum</i>
Hôtes principaux	Vigne* Figuier Jasmin Peuplier	Vigne** Fraisier** Framboisier** Rosier** Pêcher** Cerisier**

Autres hôtes	Le genre <i>Citrus</i>	Le genre <i>Rubus</i> **
	Mûrier	Pommier**
	Fraisier	Houblon**
	Les « <i>prunus</i> »	Hêtre
	Poirier	Chou
	Pommier	Carotte
	Pistachier	Trèfle rampant**
	Noyer	<i>Stellaria media</i>
	Hêtre	+ de façon générale sans donner le détail des espèces infectées :
	Pin	
	Chêne	Prairies
	Haies	Bois
	Ortie (<i>Urtica urens</i>)	Haies
	Rosier	
	<i>Cydonia oblonga</i>	

Tableau 3 – Plantes hôtes de *X. index* et *X. diversicaudatum* * plante hôte du GFLV, ** plante hôte de l'ArMV (ESMANJAUD 2000)

Le tableau illustre la capacité de l'ArMV à infecter beaucoup de plantes très communes alors que le GFLV reste inféodé à la vigne. Daniel ESMENJAUD donne ici 4 plantes comme hôtes principaux de *X. index*, mais le figuier semble être, avec la vigne, la plante qui permet la meilleure prolifération des populations. Le figuier est d'ailleurs utilisé dans de nombreuses expériences pour maintenir des populations de vecteurs sous serres ou pour étudier la capacité de survie du nématode sous différentes conditions. *X. diversicaudatum*, à l'inverse de *X. index*, trouve facilement beaucoup de plantes favorables à sa multiplication.

L'étude des gammes d'hôtes des deux virus et des vecteurs nous permet de constater que le pathosystème décrivant l'infection par le GFLV est basée sur une spécificité extrême,

bien plus poussée que pour l'ArMV. Le comportement alimentaire de *X. diversicaudatum* et sa capacité à transmettre l'ArMV à beaucoup de plantes de sa gamme d'hôtes, entraîne l'existence de nombreux foyers de vecteurs qui peuvent rester virulifères. Ces réservoirs de vecteurs existent aussi pour *X.index* mais sont beaucoup moins importants dans la gestion de la replantation des parcelles pour deux raisons : d'une part les plantes capables d'héberger ce nématode sont peu nombreuses et, de plus, elles ne sont pas hôte du virus. Le nématode perdant son pouvoir virulifère à chaque mue, même s'il persiste grâce à ces hôtes, ne sera rapidement plus virulifère. Si les plantes de la gamme d'hôtes de *X. index* ne constituent pas de réservoir du GFLV, il existe cependant au vignoble d'importants réservoirs d'inoculum du virus constitués par les repousses spontanées de vigne pas totalement détruites lors de l'arrachage, et par les racines ou des même des débris de racine restant dans le sol (FINETTI-SIALER M.M. et CIANCIO A., 2004).

Il faut noter à ce niveau qu'une étude récente, publiée en 2003, a montré qu'une graminée était un réservoir potentiel du GFLV (IZADPANA K. et ZAKI-AGHL M., ainsi que ZHANG Y.P. et al., 2003). Le virus a été détecté dans des échantillons de Bermuda Grass (*Cynodon dactylon L.*) d'Iran par RT-PCR ainsi que par des tests ELISA (utilisation d'un antisérum spécifique d'un isolat nord-américain). Les résultats ont été confirmés par clonage et séquençage des produits de RT-PCR qui étaient bien des fragments du gène de la CP du GFLV. Le virus a également été transmis de BG à *Chenopodium quinoa* par inoculation mécanique. Certains isolats ont provoqué des taches chlorotiques et une déformation des feuilles sur *C. quinoa*. D'autres n'ont pas induit de symptôme. Il a également été prouvé par des tests ELISA et PCR positifs que les plants de *C. quinoa* montrant des symptômes, comme ceux n'en montrant pas, ont été réellement infectés. Ces résultats obtenus par deux laboratoires (l'un Iranien et l'autre américain) de grande renommée et possédant de bons moyens, paraissent donc importants à considérer et pourraient remettre en cause les capacités du GFLV à infecter des plantes herbacées en conditions naturelles. En effet, jusqu'ici, le corps scientifique mondial considère que *Vitis vinifera* et les autres espèces de *Vitis* constituent le seul véritable réservoir de virus connu. De plus, la transmission à des plantes herbacées par inoculation mécanique (par la sève) n'a été possible que sur certaines familles de plantes. La gamme d'hôte expérimentale du GFLV semblait être limitée à des espèces appartenant à cinq familles seulement : les *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Solanaceae* et *Fabaceae* (ANDRET-LINK P. et al, 2004 (a)) et jamais aucune transmission à une graminée n'avait été obtenue (comme pour les autres *Nepovirus* d'ailleurs). Ces découvertes récentes entrouvrent donc de nouveaux horizons sur l'épidémiologie de la maladie puisque les

graminées sont présentes partout au vignoble. L'étude citée ci-dessus précise que la plupart des échantillons de BG infectées ont été collectés à côté de vignobles infectés par le GFLV. La BG infectée par le virus est largement répartie dans la province « FARS » en Iran (IZADPANAHI K. et ZAKI-AGHLI M., ainsi que ZHANG Y.P. et al., 2003).

c - Etude de la distribution des nématodes au vignoble / mobilité des nématodes

La présence de nématodes dans le sol est corrélée essentiellement à deux paramètres qui sont la porosité et l'hygrométrie du sol. Les nématodes vecteurs des différents virus de la dégénérescence infectieuse, les *Xiphinema* et les *Longidorus* (+ *Paralongidorus*) s'accommodent en général d'une assez grande variété de sols. *Xiphinema index* affectionne tout particulièrement les terrains lourds mais peut également se retrouver dans des horizons sableux. Sa présence plus fréquente en sols lourds est due au fait que ces sols subissent moins la dessiccation à laquelle il est sensible.

Xiphinema diversicaudatum, en revanche, est retrouvé le plus souvent dans des terrains légers. Il a été montré que la survie de *X. diversicaudatum* était faible en sol sec et en sol saturé en eau. Ces observations ont été utilisées, comme nous le verrons plus loin, pour essayer de lutter contre les nématodes notamment en inondant les parcelles.

i - Distribution verticale

La distribution verticale des nématodes dans le sol dépend avant tout de la disponibilité en racines. Des études très complètes concernant la distribution verticale des nématodes du court-noué ont été réalisées dans des vignobles de différentes régions :

ESMENJAUD D. *et al.*, 1992 dans la région champenoise.

DELEMARRE F., 2005 et FIOLEAU V., 2004 dans la région bordelaise.

FEIL *et al.*, 1997 dans un vignoble californien.

SCOTTO LA MANÈSE *et al.*, 1988 dans le Vars

VUITTENEZ, 1961 en Alsace

SILVA *et al.*, 1988 dans un vignoble portugais.

Prenons pour exemple les résultats obtenus dans l'expérience menée par Daniel ESMENJAUD, Bernard WALTER et leurs collègues en 1992. Le but de leur travail était

d'étudier la distribution verticale de *X. index* et sa relation avec les facteurs édaphiques. L'étude des populations de nématodes a été effectuée sur 3 parcelles atteintes de court-noué dans la région Champenoise. La distribution verticale de *X. index* a été investiguée au niveau de chaque horizon d'un profil pédologique. Les effectifs les plus faibles ont été observés entre 0 et 25 cm dans la parcelle la plus argileuse et entre 0 et 40 cm dans les 2 autres parcelles plus sableuses. Les effectifs les plus élevés ont été retrouvés dans l'horizon 55-70 cm de la parcelle Mesnil (la plus argileuse) et au delà de 90 cm dans la roche mère de craie pour les deux autres appelées Cumières 1 et Cumières 2 (figure 17 page suivante) (ESMENJAUD D. et al., 1992).

Le graphique de la figure 17 montre que plus le terrain a une texture légère, plus les nématodes ont tendance à s'enfoncer. En effet, dans la parcelle Mesnil où la terre est forte on retrouve beaucoup de nématodes à une profondeur moyenne (40 à 50 cm). Dans les deux autres parcelles où la terre est plus légère et donc plus sèche, les nématodes se trouvent plus en profondeur, probablement pour ne pas souffrir de la dessiccation lors des périodes chaudes et sèches.

La parcelle Cumières 1 avait été désinfectée avant plantation alors que les deux autres ne l'avaient pas été. De plus, Cumières 1 est entretenue mécaniquement. Cette étude a également permis d'évaluer, dans ce cas précis, l'influence de la désinfection et du travail du sol sur les populations de nématodes. Un profil de la rhizosphère des différentes vignes a également été réalisé pour mettre en relation la quantité de nématodes à une profondeur donnée avec la quantité de racines fines (<2mm) sur lesquelles ils se nourrissent à cette même profondeur.

Les conclusions tirées de ce travail sont les suivants :

Pour ce qui est des effectifs rescencés

La champagne est une région où les populations de nématodes dans les couches profondes sont plus élevées que dans la majorité des vignobles infectés où l'on se situe environ entre 1 et 5 individus par kg de sol (DALMASSO A., 1970 ; VALLOTON R. et PERRIER J.J., 1990). Le nombre de vecteur rescencé est cependant moins important que dans les régions méditerranéennes (ESMENJAUD D. *et al.*, 1988 ; SCOTTO LA MANESE C. *et al.*, 1988).

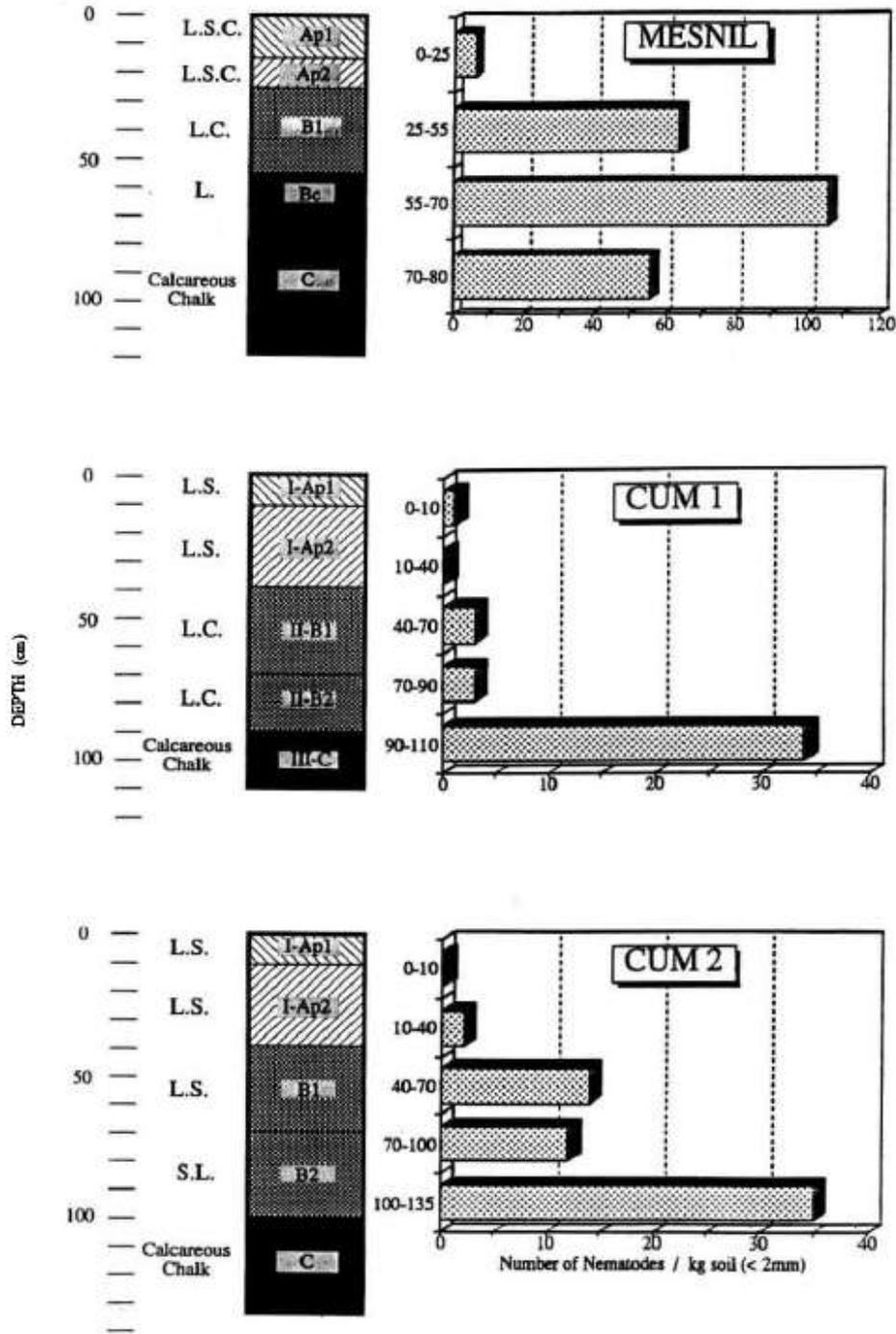


Figure 17 : Distribution verticale de *X. index* dans la parcelle Mesnil et les parcelles Cumières 1 et 2. (Source : ESMENJAUD D. *et al.*, 1992).

La figure 17 présente la distribution verticale de *X. index* et le profil caractéristique des différents horizons pédologiques des parcelles infectées par le GFLV à Mesnil sur Oger et dans le district de Cumières (région champenoise). Les barres de l'histogramme correspondent à une moyenne de 3 échantillonnages de 1700g de sol pour chaque horizon. L.S.C : loamy-sandy clay ; LC : loamy clay ; LS : loamy sand ; SL : sandy loam ; L : loam.

La population la plus importante a été trouvée dans le sol le plus argileux (Mesnil), représentant de 56 à 106 individus aux 3 profondeurs. On voit aisément sur le graphique présenté ci-dessus que les populations sont moins importantes dans les 2 autres parcelles plus sablonneuses. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Vuittenez *et al.* (1972) pour le vignoble français et ceux de VALLOTON et PERRIER (1990) pour le vignoble suisse qui ont observés que les sols lourds avaient les plus grandes densités de nématodes.

Pour ce qui est de la distribution verticale des nématodes

Il a été retrouvé plus de nématodes dans les couches moyennes et dans les couches profondes. Les très faibles densités rencontrées en surface peuvent être dues soit :

- à l'influence de la culture du sol ainsi qu'à la désinfection préalable à la plantation pour la parcelle CUM 1.
- pour les deux autres parcelles, les auteurs ont conclu que le gel était le facteur limitant le développement du nématode en surface. En effet, les parcelles étudiées étaient en situation très gélives (exposition et climat de la région). Cette hypothèse avait déjà été démontrée par DALMASSO A. en 1970.

La grande profondeur à laquelle ont été retrouvés des nématodes, dans la roche mère, vient soutenir les résultats d'autres études dans lesquelles des vecteurs ont été pris à des profondeurs étonnantes. Ainsi, VALLOTON et PERRIER ont détecté des nématodes à 3,50m dans la région de Vinzel en Suisse. De même un rapport épidémiologique effectué dans un vignoble californien fait état de nématodes retrouvés à 3,60 mètres (FEIL *et al.*, 1997). Horsmis ces cas extrêmes, il n'est pas rare de rencontrer des nématodes aux alentours des 1,50 mètres de profondeur (DEMANGEAT G., 2007).

Ces résultats ont également démontré l'inefficacité de la désinfection des sols (méthode de lutte que nous allons détailler plus loin) en Champagne, les nématodes étant trop profond dans le sol.

Enfin, la seule zone sans nématode (exceptée de 0 à 10cm) est trouvée à CUM 1 entre 10 et 40 cm. Cette zone correspond aussi à une partie du sol de cette parcelle où il n'y a pas de racines fines. Cependant, aucune étude n'a démontré de relation entre la densité de nématodes et la densité en racines fines.

Il faut donc retenir que de façon générale, la distribution verticale des vecteurs est à prendre en compte dans le contrôle du court-noué et dépend :

- de la survie du nématode sous différents climats

- des conditions édaphiques
- des pratiques culturales
- de la gestion des traitements.

ii - Distribution horizontale

Pour une parcelle donnée, la dispersion horizontale des nématodes dépend principalement du nombre de générations de vignes plantées sur cette parcelle depuis l'introduction du nématode (ESMENJAUD *et al.*, 1992). En effet, l'extension de la maladie est lente et est essentiellement due aux travaux qui précèdent une replantation, les outils agricoles entraînant avec eux les nématodes infectieux. Les nématodes ne sont pas présents de façon homogène dans un vignoble infecté. Ils sont répartis en foyers circulaires correspondant aux zones présentant des symptômes aériens. Ils ne se déplacent horizontalement et verticalement que suivant la progression des racines aux dépens desquelles ils se nourrissent. Lorsque les ceps présents au milieu d'un foyer de court-noué meurent, le nématode se déplace vers la périphérie du cercle pour se nourrir sur de nouvelles plantes. Les nématodes, que se soit *X. index* ou *X. diversicaudatum* ne sont capables de se déplacer ainsi que de quelques centimètres par ans. En conditions défavorables, c'est-à-dire en l'absence de nourriture, ils peuvent effectuer un déplacement allant jusqu'à une cinquantaine de cm au maximum par an.

Nous avons dit que les nématodes infectieux se situent là où l'on peut voir des symptômes aériens sur la vigne. Cependant, des nématodes peuvent être présents au-delà de la zone montrant des symptômes viraux, et il peut se dérouler plusieurs mois, voire un à deux ans, avant qu'ils n'entrent en contact avec les racines d'une autre souche (ESMENJAUD D, 2000). Il peut également se dérouler 1 à 2 ans avant qu'un cep infecté n'exprime les symptômes. Cette expression varie en fonction des conditions climatiques et du cépage.

D'autre part, ce déplacement horizontal « naturel » du nématode peut être modifié par un certain nombre de facteurs, notamment liés aux activités culturales. Ainsi, les nématodes peuvent être traînés ou emportés par des outils agricoles lors des travaux de désherbage de l'inter-rang ou du cavaillon. La contamination des parcelles situées en aval d'un secteur contaminé peut aussi se faire par l'érosion du sol et le ruissellement des eaux (ravinement, inondations...). Ceci est particulièrement vrai pour les parcelles irriguées mécaniquement dans lesquelles le ruissellement est très important. Il faut également tenir compte du rôle de transport des eaux souterraines (WALTER B. *et al.*, 2000). Ces types de dissémination

peuvent donner, en cours de culture, la fausse impression d'une mobilité importante du nématode. Les foyers de court-noué peuvent ainsi être très vite multipliés dans la parcelle.

Enfin, la répartition des nématodes dans un plan horizontal semble montrer un niveau de population plus élevé sous le rang (cavaillon) que dans l'inter-rang (FEIL H. *et al.*, 1997).

a) Etude des temps de rétention des virus : *Nepovirus*-
nématode = une interaction solide.

Une des caractéristiques de l'association virus-vecteur est sa persistance dans le temps. Elle se traduit par une contamination quasi-perpétuelle des nouvelles plantations, même après de très longues périodes de jachère. La biologie des nématodes et leur cycle de vie sont directement corrélés à cette longévité de l'association. Les nématodes ont des cycles de vie très longs, un faible taux de reproduction et des possibilités de survie dans des biotopes où les conditions biotiques et abiotiques sont fluctuantes. Dans le cas de *X. diversicaudatum*, il peut également persister grâce à sa polyphagie dans des sols sur lesquelles une rotation de différentes cultures est effectuée. Illustrons cette persistance à l'aide d'exemples. Une cartographie fine de la distribution des nématodes a été reconduite 30 ans après arrachage d'une parcelle de framboisiers fortement infectée par l'ArMV et son vecteur associé, *X. diversicaudatum*. Cette nouvelle analyse montre une présence et une distribution identique du vecteur et de son virus associé à celle qui existait 30 ans auparavant malgré la succession de périodes de jachères et de différentes cultures qui, dans certains cas, n'étaient pas des hôtes connus du vecteur et/ou du virus (DEMANGEAT G., 2007). Les connaissances sur la longévité de l'association virus-vecteur en conditions naturelles sont limitées. Cependant, elle a été évaluée à plusieurs reprises pour l'association GFLV- *X. index* suite à la mise en oeuvre de programmes de replantation. Après une période de repos de 6 ans du sol (sans aucune plante) dans une parcelle de vigne totalement contaminée par *X. index* et le GFLV, 6% des nouveaux plants de vigne sont réinfectés par le GFLV. De même, 5 ans de jachère n'ont pas réussi à éliminer *X. index* et le GFLV dans une parcelle naturellement infectée (résultats compilés par Gérard DEMANGEAT dans DEMANGEAT G., 2007). Des résultats similaires avaient déjà été rapportés par VUITTENEZ dans une étude datant de 1969 avec un taux d'infection de 5% après 5 ans de jachère dans un vignoble naturellement infecté (VUITTENEZ *et al.*, 1969). Suite à ces observations au champ, il est recommandé, pour espérer une éradication totale de la population des *X. index* virulifères d'une parcelle de vigne,

de laisser le sol en jachère nue pendant une période de 7 ans minimum (DEMANGEAT G., 2007). Cette période est très discutée puisque la survie des nématodes et leur capacité à retenir le virus dépend de trop de facteurs pour définir un consensus bien adapté à chaque cas. Ainsi, dans la littérature, les différents auteurs conseillent des périodes avant replantation allant de 4 ans à 10 ans de repos du sol en jachère totale (CHOVELON M., 2006 ; LEONHARDT W. *et al.*, 1998 ; SRPV-pays de la Loire, 2005 ; DESCOINS C., 2005 ; FUCHS M. 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, 2003 ; JOHNSON R.C. 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, 2003 ; FINETTI-SIALER M.M. et CIANCIO A., 2004 ; VUITTENEZ A. *et al.*, 1969).

D'autre part, la contamination de jeunes plants de vigne dans un sol infecté peut être très rapide. Elle dépend de la densité du nématode dans le sol et elle est liée au nombre de générations successives qui ont permis l'installation du nématode infectieux dans la parcelle. En sol très contaminés, l'installation de jeunes plants est fortement compromise car il y a une forte probabilité de rencontre entre le nématode encore très infectieux et les jeunes racines. Ainsi, des replants de Pinot noir/SO4 intercalés dans une parcelle fortement infectée par le GFLV sont contaminés à 44% après 1 an et à 100% au bout de la troisième année. La rapidité de la contamination virale est une préoccupation pour les vignes en production puisque plus la contamination se fait tôt sur de jeunes plants, plus les dégâts risquent d'être précoces et importants (WALTER B., 2000). Une infection très rapide du cep peut fréquemment aboutir à sa mort dès les premières années suivant sa plantation (cf dégâts).

Ces données de persistance observées sur le terrain sont en accord avec des données expérimentales obtenues en conditions contrôlées. Dès 1964, TAYLOR et RASKI avaient constaté que *X. index* pouvait rester virulifère pendant plus de 8 mois dans un terreau stérile en l'absence de plantes hôtes (TAYLOR et RASKI, 1964). De même, *X. diversicaudatum* est capable de transmettre l'ArMV après 9 mois de conservation en conditions contrôlées, dans des sols exempts de toute racine (Mc NAMARA D.G., 1980). Des études intéressantes concernant d'autres associations de la dégénérescence infectieuse entre des nématodes du genre *Xiphinema* et leur *népovirus* associés ont donné des résultats similaires. Ainsi *X. americanum sensu stricto* est capable de transmettre le TRSV après 9 mois de conservation dans un sol ne lui offrant pas de nourriture (Mc GUIRE J.M., 1973). Après deux ans de conservation en l'absence de plante hôte, dans des conditions de température et d'humidité contrôlées, *X. rivesi* reste capable de transmettre le ToRSV à des plantes pièges (BITTERLIN M.W. et GONSALVES D., 1987).

Plus récemment, dans les laboratoires de l'Unité Mixte de Recherche INRA-Université Louis Pasteur 'Santé de la Vigne et Qualité du Vin' de Colmar, Gérard DEMANGEAT et son équipe ont développé une méthode de RT-PCR capable de détecter le GFLV dans un seul individu de *X. index* (DEMANGEAT G. *et al.*, 2004). En utilisant cette nouvelle technique reproductible, ils ont pu étudier la persistance de l'association *X. index*-GFLV dans des conditions bien déterminées. Les échantillons de sol provenaient d'une parcelle de vigne naturellement contaminée et ont été conservés à 7 et 20°C pendant 4 ans en l'absence de plante hôte. Pendant ces 4 années, la population initiale de *X. index* a significativement diminué (adultes et larves) mais des individus vivants ont pu être isolés pour les deux conditions de conservation. Dans ces nématodes vivants, isolés après 4 ans de stockage, la présence du GFLV a été clairement mise en évidence (DEMANGEAT G. *et al.*, 2005 (b)). Cette capacité de survie en l'absence de plante hôte ou lors de conditions défavorables correspondrait à un arrêt de l'ensemble du métabolisme conduisant à un blocage de son développement : c'est la quiescence. Comme nous l'avons dit dans la biologie des nématodes, cette capacité à entrer dans des phases de quiescence concerne tous les stades de développement, limitant ainsi la mortalité d'une population. Des nématodes des espèces *Paralongidorus maximus* et *Xiphinema pachtaicum* ont été observés fortement enroulés sur eux-même dans du sol en état de dessiccation. Des comportements semblables ont été observés dans les laboratoires de l'INRA de Colmar à partir d'élevages de *X. index* laissés en serre sans arrosage pendant de longues périodes. Un rétablissement partiel de l'hygrométrie a relancé une activité de ces nématodes (DEMANGEAT G., 2007).

Disons quelques mots sur les interactions virus-vecteur de la dégénérescence infectieuse faisant intervenir le genre *Longidorus*. Ces nématodes possèdent les mêmes capacités de survie que les *Xiphinema*. Par contre, ils retiennent les particules virales sur des périodes beaucoup plus courtes, n'excédant pas quelques semaines. Cette différence de temps de persistance des particules virales est probablement liée à la différence de localisation des particules virales au niveau de la partie antérieure des nématodes (cf description des nématodes).

En conclusion, la grande capacité de survie des nématodes et leur capacité à rester virulifère sur des très longues périodes (plus de 4 ans) complique sévèrement le contrôle de la virose du court-noué par l'éradication des populations indigènes de nématode présentent dans les vignobles atteints.

2 - Transmission par le matériel de propagation

L'espèce *X. index* a été disséminée en même temps que la culture de la vigne. Son aire d'origine pourrait être le Moyent-Orient. Le GFLV semble en effet être originaire de l'ancienne Perse et a probablement existé dans l'ouest de l'asie et les régions méditerranéennes depuis les premiers temps de la viticulture. Il s'est ensuite répandu vers l'ouest pour finalement être présent aujourd'hui dans le monde entier (IZADPANA K. *et al.*, 2003). Le transport des plants de vigne, en particulier certains cultivars de l'espèce *Vitis vinifera* qui n'extériorisent pas de symptômes caractéristiques, a joué un rôle très important dans la dissémination à longue distance du virus et du vecteur. En effet, les contaminations initiales d'un vignoble sont principalement dues à l'introduction de plants avec du sol contaminé par le nématode à l'état virulifère. Pour éviter ce type de contamination des schémas de certification sanitaire des plants de vigne ont été élaborés dans les différentes régions du monde.

Les risques de contamination sont aussi à prendre en compte dans la mise en place et le suivi des parcelles mères de bois et de boutures de porte-greffes et de greffons. Dans le cadre de la sélection sanitaire, des mesures réglementaires doivent être mises en oeuvre pour l'implantation de parcelles mères devant servir à la confection de matériel de base ou de matériel certifié. Nous détaillerons le fonctionnement de la sélection sanitaire et les schémas qui la régisse dans le chapitre « méthodes de lutte ». On peut déjà dire dans ce chapitre sur l'épidémiologie de la maladie, que si les précautions sont prises, il est possible de conserver une parcelle à l'abri des contaminations, comme vient de le montrer l'inventaire sanitaire qui a été réalisé sur l'ensemble des parcelles mères françaises avec plus de 90% en surface de vignes saines. Cet inventaire sanitaire du parc a été réalisé sur quatre campagnes de 1995-1996 à 1998-1999. Les résultats sont reportés dans les tableaux page suivante (tableau 3 et 4) (DEMANGEAT G. *et al.*, 2005 (c)). Dans le cas de tests positifs, après détermination d'un périmètre de sécurité, la parcelle est soit radiée, soit arrachée. Si elle est arrachée elle peut l'être totalement ou partiellement (DEMANGEAT G. *et al.*, 2005 (c)).

Vignes mères de porte-greffe.			
	Vignes inscrites	Vignes saines	Vignes arrachées
Surfaces	1698 ha	1560 ha (92%)	138 ha (30%)
Nombre de parcelles	2528	2153 (85,30%)	375 (14,8%) dont 181 partiellement (7,1%) et 194 en totalité (7,7%)

Tableau 4 : Inventaire sanitaire du parc des vignes mères de porte-greffe. (Source : DEMANGEAT G. *et al.*, 2005 (c)).

Vignes mères de greffons.			
	Vignes inscrites	Vignes saines	Vignes arrachées
Surfaces	1382 ha	1256 ha (90,9%)	126 ha (9%)
Nombre de parcelles	6074	5420 (78,40%)	654 (11%) dont 178 partiellement (3%) et 476 en totalité (8%)

Tableau 5 : Inventaire sanitaire du parc de vignes mères de greffons. (Source : DEMANGEAT G. *et al.*, 2005 (c)).

La coexistence des deux modes de dissémination de la virose, l'un par les vecteurs naturels des virus et l'autre par le transport de matériel contaminé, implique que les méthodes de diagnostic de la maladie doivent non seulement être basées sur la recherche des virus dans la plante, mais doivent aussi permettre de connaître le potentiel virulifère des vecteurs présents dans une parcelle devant être replantée. Ce sont ces méthodes de dépistage que nous allons maintenant détailler.

B - Méthodes de dépistage

Les méthodes de dépistage consistent à caractériser la présence de virus dans les populations de nématodes et, par conséquent, à identifier au préalable le nématode lui-même. Il s'agit également de connaître l'état sanitaire des plantes par la recherche du virus au sein même des différents tissus de celles-ci. Ce sont les moyens d'identification et de caractérisation moléculaire des vecteurs et des virus permettant le dépistage de la virose sur la vigne ainsi que la mise en évidence de la présence de virus dans les populations de *Longidoridae* que nous allons présenter dans ce chapitre.

1 - Identification des vecteurs

Les nématodes font partie des espèces animales les plus difficiles à identifier. Des méthodes de caractérisation des différentes espèces sont fondées sur des mesures très précises des individus et sur la recherche de caractères morphologiques. Ce type d'identification est réalisé à l'aide de loupes binoculaires ou de microscopes. Il existe des clefs d'identification mises au point par LOOF et LUC en 1989 pour les espèces du groupe *X. europeanum*, et par LAMBERTI et CARONE pour les individus du groupe *X. americanum*. Cependant, le manque d'homogénéité des populations et les caractéristiques morphologiques communes des différentes espèces de *Longidoridae* rendent ces techniques très difficiles à utiliser et nécessitent un très haut degré d'expertise. En effet, le plus fréquemment sur le terrain, on rencontre des populations constituées par des individus à différents stades de développement ou correspondant à des mélanges d'espèces et de genres différents. Une dizaine, parfois plus, de nématodes appartenant au seul genre *Xiphinema* sont présents dans toutes les principales régions viticoles du monde, à savoir : *X. algeriense*, *X. americanum*, *X. brevicolle*, *X. diversicaudatum*, *X. index*, *X. italiae*, *X. mediterraneum*, *X. pachtaicum*, *X. turcinum*, *X. vuittenezi* (Vectors of plant viruses, 2008). Pour note, une étude épidémiologique récente sur les parcelles de 9 des plus prestigieux châteaux du Bordelais à montrer la présence d'effectifs assez importants de *X. pachtaicum* et *X. rivesi* (FIOLLEAU V., 2004).

La difficulté de l'identification des *Longidoridae* est encore accrue par le fait que ces nématodes sont souvent présents en faibles effectifs. Dans la majorité des vignobles infectés des zones septentrionales on se situe à environ 1 à 5 individus par kg de sol (d'après DALMASSO A., 1970 et VALLOTON R. et PERRIER J.J., 1990). Dans les régions

méditerranéennes les effectifs sont plus importants, et de façon très générale, on peut dire que les effectifs moyens rencontrés sont de l'ordre de 10 individus par kg de sol (DESCOINS C., 2005). Ces chiffres n'ont pas une grande valeur tant la disparité entre les parcelles, et même les différentes zones d'une parcelle, est importante. Cependant, ils illustrent bien les difficultés qui peuvent être rencontrées pour le recueil des nématodes dans les sols et leur identification ultérieure. Les prélèvements de sol doivent être réalisés selon des méthodes rigoureuses. Lors de l'étude que nous venons de citer, menée par l'UMR santé végétale de l'INRA-ENITA de bordeaux en partenariat avec 9 grands châteaux du Bordelais, plusieurs étudiants ont travaillé sur les techniques d'échantillonnage des sols viticoles et les méthodes d'extraction des nématodes. La couche superficielle est dégagée jusqu'à 30-40 cm de profondeur de façon à accéder au niveau des jeunes racelles blanches, source de nourriture des nématodes. La mort des nématodes peut être très importante lors de l'échantillonnage du sol. Il est préférable d'utiliser des outils qui permettent de ne pas trop déstructurer le sol, telle une pelle ou une truelle. L'utilisation de petites tarières peut endommager plus de 85% des individus présents. Les prélèvements de sol sont constitués d'environ 1,5 à 2 kg de sol qui doivent contenir autant que possible des mottes traversées par un maximum de racelles sans séparer terre et racines. Les racines de diamètre supérieur à 1-2 mm ont peu de chances d'être encore piquées par les nématodes, et il vaut mieux préférer les racelles sur lesquelles ils se nourrissent (ESMANJAUD D., 2000). Les périodes idéales de prélèvement des nématodes du genre *Xiphinema* sont le printemps et l'automne, afin d'éviter les périodes de gelées ou de sécheresse.

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des nématodes. Nous pouvons citer ici les deux plus utilisées en routine :

- La méthode d'OOSTENBRINK.

Elle est largement utilisée. Le principe consiste à récupérer les nématodes intéressants par une sédimentation des éléments à l'aide d'un débit d'eau dans un appareil appelé élutriateur d'Oostenbrink. Un courant d'eau ascendant permet la sédimentation des éléments les plus lourds et le maintien en suspension des nématodes. Après avoir récupéré les nématodes de l'élutriateur en suspension dans l'eau, une filtration est réalisée, en général sur filtres en ouate de coton. Cette filtration est active, c'est-à-dire que les nématodes doivent nager à travers le filtre, celui-ci étant immergé. Seules quelques espèces de nématodes (dont les *Xiphinema*) sont capables de traverser ces filtres. Cette méthode permet une extraction

rapide (de l'ordre de 20 min) et facilite l'identification des espèces en réduisant les particules de terre et de matières organiques présentes à la fin de l'extraction. La filtration est assez longue, de l'ordre de 3 jours. Des pertes de l'ordre de 18% de nématodes après 3 jours de filtrage avec un filtre en ouate de coton ont été rapportées par VERSCHOOR et DE GOEDE (VAN HELDEN M., 2005).

- La méthode COBBS

Elle tient son nom du chercheur qui l'a mise au point en 1918. Il s'agit très simplement de filtrations successives sur des tamis de plus en plus fins qui vont aller de 2,5mm à 50µm. Elle est moins utilisée que la méthode d'Oostenbrink pour les sols viticoles puisque les faibles effectifs de *Xiphinema* dans ces sols nécessiteraient de filtrer des volumes trop importants par rapport à la capacité des tamis.

Nous savons désormais que la reconnaissance des vecteurs du court-noué sur leurs seuls caractères morphologiques est difficile, d'autant plus que les effectifs sont faibles, et les populations hétérogènes. Ces dernières années, l'essor de la biologie moléculaire et la connaissance du génôme des nématodes ont permis de proposer des approches moléculaires pour faciliter et augmenter la fiabilité de l'identification des vecteurs. Des protocoles d'identification de certaines espèces de *Longidoridae*, qu'elles soient vectrices ou non de virus, ont été développés. Ils sont fondés sur la connaissance des séquences correspondant aux ITS (Internal Transcribed Spacer). Les ITS sont des séquences d'ADN ou d'ARN ribosomiques qui sont utilisés pour des études phylogénétiques (FERNANDEZ A. *et al.*, 2001) et pour la mise en évidence d'espèces nouvelles. Ces séquences sont amplifiées par PCR, selon des protocoles d'amplification multiplex utilisant des amorces spécifiques. Ils permettent de différencier spécifiquement des espèces de *Xiphinema* et de *Longidorus* qui sont très proches morphologiquement les uns des autres (DEMANGEAT G., 2007). WANG X. et son équipe, en 2002 ont mis au point un protocole multiplex permettant de différencier 4 espèces de *Xiphinema* : *X. index*, *X. diversicaudatum*, *X. vuittenezi* et *X. italiae* (WANG X. *et al.*, 2003). L'année suivante, a été menée une étude ayant pour but de confirmer la spécificité et de déterminer la sensibilité et la fiabilité des amorces pour les deux espèces vectrices du court-noué, *X. index* et *X. diversicaudatum*. Aucun produit de PCR (à une exception près) n'a été observé quand les amorces ont été testées avec 6 espèces de *Longidorus*, un *Paralongidorus* et un *Xiphinema* non vecteur du court-noué. Avec les mêmes amorces testées sur une communauté typique de nématodes provenant d'un sol viticole, il n'a également été

amplifié aucun produit de PCR. Ces résultats ont abouti à la conclusion qu'étant donné leur spécificité, sensibilité et fiabilité, ces amorces diagnostic seront d'un grand bénéfice pour les services phytosanitaires ou de quarantaines (HÜBSCHEN J. *et al.*, 2004 (a)). En 2005, le Scottish Crop Research Institute (Ecosse), le Central Laboratory of General Ecology (Bulgarie), et l'Instituto Biológico de Campinas (Brésil) ont développé, en collaboration, une méthode multiplex toujours basée sur le même principe, permettant l'identification de cinq autres espèces de *Xiphinema*, à savoir : *Xiphinema brevicolle*, *X. diffusum*, *X. elongatum*, *X. ifacolum* et *X. longicaudatum* (OLIVEIRA C.M.G. *et al.*, 2005). En 2007, on dispose d'amorces pour l'identification de 9 espèces de *Xiphinema* et 8 espèces de *Longidorus* (DEMANGEAT G., 2007). Ces procédures sont suffisamment sensibles pour permettre l'identification d'un seul individu dans un échantillon, quel que soit son stade de développement (larves ou adultes). En effet, l'étude conduite par Judith HÜBSCHEN a prouvé qu'un seul individu de *X. index* ou *X. diversicaudatum* pouvait être détecté parmi 1000 individus de *X. vuittenezi* et parmi une communauté de 200 individus provenant d'un sol viticole (HÜBSCHEN J. *et al.*, 2004 (a)). Lors d'un autre travail mené la même année, cette équipe a montré qu'un individu cible pouvait être détecté et identifié au sein d'une population de 800 autres nématodes issue d'un vignoble allemand (HÜBSCHEN J. *et al.*, 2004 (b)). Ces méthodes sont donc faciles à mettre en oeuvre (kit d'amorces), reproductibles et très sensibles. Elles présentent un gros intérêt par rapport aux méthodes classiques d'identification basées sur la mesure des nématodes et leurs caractères morphologiques, surtout que ces dernières sont réalisées principalement à partir des adultes qui ne sont pas toujours présents en nombre suffisant dans les échantillons récoltés.

Après avoir détaillé les méthodes d'extraction et d'identification des nématodes cibles du court-noué, nous allons nous intéresser à leur pouvoir virulifère. En effet, l'objectif dans le cadre du dépistage de la maladie, est de connaître la capacité des vecteurs à transmettre les agents infectieux. La caractérisation des virus dans les nématodes est un défi supplémentaire qui est aujourd'hui facilité, comme nous allons le voir, par la mise en place de techniques de plus en plus rapides et fiables.

2 - Caractérisation de la présence de virus dans les nématodes

Tout d'abord, notons que l'étape de caractérisation du potentiel virulifère des nématodes est évidemment nécessaire pour déterminer le caractère infectieux d'un sol destiné à la replantation, mais est aussi indispensable dans le cadre d'études plus fondamentales visant à étudier la nature des interactions virus-vecteur. Ceci explique la grande activité de recherche et la multitude de publications que l'on peut trouver autour de la caractérisation de la présence des virus du court-noué dans leurs vecteurs respectifs. Cette étape doit être de plus en plus rapide, sensible et facile à mettre en œuvre, pour ne pas ralentir les programmes de replantation ainsi que les études au laboratoire.

Pendant de nombreuses années, la présence des virus du court-noué dans les *Xiphinema* était évaluée de manière indirecte en mettant les nématodes isolés en contact avec des plants de vigne hôtes, sensibles au nématode et au virus, et connus pour bien extérioriser les symptômes. Cette procédure est longue, fastidieuse et nécessite des structures importantes (DEMANGEAT G., 2007). Puis, l'immunomicroscopie directe ou indirecte par fluorescence a été utilisée. Elle permet de mettre en évidence la présence du virus dans un seul nématode (vectors of plant viruses, 2008). Par contre, cette technique est complexe et demande des équipements coûteux ainsi qu'une expertise en microscopie, ce qui la rend inadaptée pour les analyses de routine (ESMENJAUD D. *et al.*, 1993).

A côté de ces deux méthodes inadaptées à un dépistage rapide, le test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est utilisé actuellement en routine pour la détection des virus, aussi bien dans le nématode que dans la plante. Pour ce qui est de la détection dans les nématodes, la technique n'est pas assez sensible pour détecter le virus à partir d'un individu unique (ESMENJAUD D. *et al.*, 1993). Bien que très facile d'utilisation, la limite du test ELISA réside dans le fait qu'il nécessite un grand nombre de nématodes pour permettre une détection efficace du virus, condition qui n'est pas toujours compatible avec les effectifs isolés à partir d'échantillons de sol. De façon générale, la technique paraît suffisamment sensible pour détecter le virus si l'on travaille sur un échantillon de plus de 10 individus virulifères (vectors of plant nématodes, 2008), alors que, dans la majorité des cas, les dépistages par ELISA sont réalisés sur des populations d'au moins 20 individus virulifères. Cependant l'étude mesurant l'état infectieux des *Xiphinema* de la parcelle Mesnil (cf distribution verticale des vecteurs) par ELISA sur des groupes d'effectif croissant de 2 à 256 individus, a montré qu'une différence de densité optique était observée dès la modalité deux individus, entre la population de la parcelle et une population témoin non virulifère élevée sur figuiers. De tels

résultats sont anecdotiques et ne permettent pas de généraliser une telle sensibilité pour la méthode ELISA.

En parallèle au développement des méthodes moléculaires permettant de caractériser les espèces de *Longidoridae*, des protocoles sensibles et reproductibles, amplifiant une partie du génôme du virus hébergé par les nématodes, ont été mis en oeuvre. A partir des ARN totaux extraits de nématodes, des expérimentations RT-PCR amplifiant spécifiquement une partie du génôme du virus ont été développées (DEMANGEAT G. *et al.*, 2004 ; FINETTI-SIALER M.M., CIANCIO A., 2005). Les séquences amplifiées spécifiquement correspondent le plus souvent au gène codant pour la protéine de capsid. Des méthodes ont été mises au point avec les séquences du gène de la protéine de mouvement (WETZEL T. *et al.*, 2001). L'intérêt ultime des techniques basées sur l'amplification de matériel génétique du virus, en plus de leur reproductibilité, leur rapidité et leur simplicité de mise en oeuvre, est la sensibilité qu'elles permettent d'atteindre. En effet, elles détectent efficacement le virus hébergé par un seul nématode. Une procédure mise en oeuvre par l'Unité mixte de recherche INRA-Université Louis Pasteur de Colmar et l'INRA Sophia antipolis a permis de mettre en évidence, dans un échantillon artificiel, un seul individu virulifère parmi 3000 individus avirulifères (DEMANGEAT G. *et al.*, 2004). De plus, dans cette même étude, l'analyse par *Sst*I RFLP des produits de PCR a permis de caractériser la nature de l'isolat de GFLV porté par le seul individu virulifère de *X. index*. La nature des isolats, dans le cas du couple *X.index*-GFLV a également été mise en évidence par PCR en temps réel dans une étude italienne de 2004 (FINETTI-SIALER M.M., CIANCIO A., 2004). Une sonde moléculaire (Scorpion) a été produite pour détecter une région hautement invariable du gène de la protéine de capsid. Une seconde région très variable du gène portant les séquences spécifiques de l'isolat viral a été utilisée pour détecter les différents isolats du GFLV grâce à des sondes moléculaires (MB). La sonde Scorpion a permis de donner une estimation quantitative des RNA2 de GFLV présents dans les nématodes. Ceci permet de connaître le potentiel virulifère ou non du nématode et, en plus, d'apprécier la quantité de virus qu'il porte. Ceci peut être intéressant pour étudier la capacité de rétention du virus, et donc de vection, d'une population de nématode. Les différentes souches de GFLV testées ont été reconnues par les MB spécifiques de l'isolat. Les deux types de sondes sont donc des outils améliorant considérablement le diagnostic de la présence du virus dans son vecteur.

3 - Le dépistage de la maladie

Après avoir détaillé le panel de moyens diagnostics pour détecter les virus du court-noué dans leurs vecteurs respectifs, nous allons désormais nous intéresser au dépistage de la maladie, c'est-à-dire à la recherche des virus dans la plante.

Il est essentiel de disposer d'outils de diagnostic qui permettent de détecter et d'identifier les viroses d'une manière fiable. Des analyses en laboratoire complètent aujourd'hui les observations visuelles, puisque ces dernières peuvent prêter à confusion (mêmes symptômes provoqués par des causes différentes) et ne mettent pas en évidence les infections virales latentes (symptômes peu ou pas visibles). La plupart des virus de la vigne peuvent être décelés par des tests spécifiques. Leur détection est pour une large part fondée sur les symptômes produits sur la variété elle-même, mais il s'agit ici d'une reconnaissance et non d'une véritable technique de dépistage. Par contre, la détection peut se faire sur une autre variété ou espèce plus sensible de *Vitis*, que l'on nomme plante-test ou indicateur, constituant une méthode de dépistage fiable. La plante test est inoculée par greffage. Les *Nepovirus* peuvent aussi être transmis par inoculation mécanique à des plantes herbacées sur lesquelles ils vont produire des symptômes caractéristiques. Les virus qui ont été bien caractérisés et pour lesquels des réactifs sont disponibles, comme c'est le cas des virus du court-noué, peuvent être détectés par des méthodes sérologiques ou moléculaires.

Dans le cadre du dépistage du court-noué nous allons détailler successivement les méthodes d'indexage biologique, puis les méthodes immunologiques et enfin la détection à l'aide d'outils moléculaires.

a - Indexage biologique

i - Greffage sur variétés indicatrices (*Vitis rupestris* St George)

L'objectif de l'indexage est de détecter la présence de virus ou d'agents « virus-like » dans des vignes en production ou sur les parcelles destinées à produire du matériel certifié. C'est dans ce dernier cas qu'il est le plus utilisé, dans le cadre de la sélection sanitaire des plants, puisque l'utilisation d'indicateurs du genre *vitis* est obligatoire dans les protocoles de certification. La technique consiste à inoculer le virus pathogène par greffage à une variété indicatrice sensible.

Etablissement et entretien des vignes mères d'indexage

Les sarments lignifiés des variétés indicatrices proviennent de vignes mères d'indexage. Des erreurs dans l'établissement et le soin apporté à ces parcelles peuvent entraver et fausser les programmes d'indexage. Avant la plantation de telles parcelles, le terrain doit être exempt de nématodes avec une attention particulière pour les espèces vectrices de virus. Les sols infectés avec des nématodes vecteurs de virus, spécialement *X. index*, ne pourront jamais être utilisés pour l'établissement de vignes mères, même après traitement nématicide. Un traitement avec un produit chimique approprié, quel qu'il soit, est recommandé avant plantation et entre chaque replantation. Le terrain doit être bien ameubli et les rangs plantés pour faciliter les travaux du sol et l'irrigation. Celle-ci sera réalisée de préférence par goutte à goutte. Une attention particulière doit également être portée au phylloxéra. En effet les variétés indicatrices ne sont pas résistantes à cette maladie qui peut provoquer des dommages sur l'enracinement des indicateurs et causer d'importants symptômes sur les feuilles et les rameaux des indicateurs.

Récolte et stockage des bois pour l'indexage

Les bois aoûtés de la saison sont collectés sur les vignes mères d'indicateurs en automne ou au début de l'hiver. Les bois sont choisis par rapport à leur taille. Ceux dont le diamètre est inférieur à 0,8-1cm ou supérieur à 2-2,5cm sont éliminés. Les bois sélectionnés sont coupés à 40/50 cm de façon à garder 6 noeuds. Ils sont ensuite stockés dans des emballages évitant leur dessèchement et stockés entre 2 et 4°C. Avant emballage, un traitement fongicide peut être utile pour prévenir de la pourriture, mais cette étape n'est pas strictement obligatoire. Ces bois conservés au frais peuvent être gardés pendant plus de 3 ans et peuvent être utilisés à tout moment.

Les bois des vignes donneuses à contrôler sont collectés, traités et conservés selon les mêmes procédures. Ces bois, bien préservés par le froid, peuvent être utilisés tout au long de l'année pour les tests ELISA visant à détecter les *Nepovirus* ou *Closterovirus* (enroulement).

Variétés indicatrices	Viroses
1. <i>Vitis rupestris</i> St George	Dégénérescence, court-noué (*) Marbrure Rupestris stem pitting Mosaïque astéroïde
2. <i>Vitis vinifera</i> Cabernet franc, Pinot noir ou autres cépages rouges (**)	Enroulement
3. Kober 5BB	Kober stem grooving
4. LN 33	Ecorce liégeuse Enations LN33 stem grooving
5. <i>Vitis riparia</i> Gloire de Montpellier	Mosaïque des nervures
6. <i>Vitis rupestris</i> x <i>Vitis Berlandieri</i> 110 R	Nécrose des nervures

Tableau 6 : Variétés indicatrices recommandées pour le dépistage et l'identification des principales viroses de la vigne
(source : extended abstract 15th meeting ICVG, 2006)

(*) Il faut noter que *Vitis rupestris* St George est utilisé comme indicateur pour tous les *Nepovirus* européens de la vigne, sauf le GCMV qui n'induit pas de symptômes sur ce cultivar et qui est indexé sur Pinot noir ou Jubileum 75. Siegfriedrebe (FS4 201-39) est la variété indicatrice utilisée en Allemagne pour le dépistage des ArMV, RRV et TBRV (WALTER B. *et al.*, 2000).

(**) Le choix du meilleur indicateur pour l'enroulement dépend des conditions climatiques locales.

Les méthodes de greffage utilisées pour l'indexage

Le greffage est effectué par différentes techniques :

- greffe en fente sur place, en parcelle d'indexage
- greffe d'écusson ou greffe oméga, sur table
- greffe en vert.

L'indexage traditionnel se pratique sur bois aoûtés et exclu donc les techniques de greffage de tissus herbacés encore appelées greffage en vert. Pour cet indexage traditionnel, différentes techniques de greffage sont pratiquées, soit sur table, soit en plein champ. Pour le greffage au champ, des écussons dormants sont greffés en fente sur des plants racinés d'un an. Un écusson (avec un bourgeon) du greffon (variété indicatrice) dont l'extrémité inférieure est taillée en pointe est inséré dans une fente de 2-3 cm réalisée dans la souche de la vigne que

l'on veut analyser et qui a été préalablement taillée. La greffe est maintenue à l'aide d'un lien (raphia) et protégée (terre, cire, mastic).

Pour le greffage sur table, des greffons à oeil (généralement les différentes variétés indicatrices) sont greffées sur des boutures racinées ou non (généralement les échantillons à analyser). Le greffage se fait manuellement ou, pour certaines techniques telles que la greffe oméga, à l'aide d'une machine (Photo 62, 63 et 64).



Photo 62 - Greffage sur table en oméga à la pépinière viticole de Vix (Vendée) (Source : Mercier – pépinières viticoles et vignobles).



Photo 63 - greffe en oméga (Source : Mercier – pépinières viticoles et vignobles).



Photo 64 - détail d'une greffe oméga en coupe. (photo : MAIGRE D., 2004)

Un greffon à oeil de 5 à 6 cm (l'indicateur le plus souvent) est greffé sur une bouture ébourgeonnée de 30 à 40 cm (de l'échantillon à tester), par une greffe en fente ou de type oméga. Le point de greffe est protégé par une cire et les assemblages sont stratifiés et placés dans une chambre chaude à 30°C environ afin de permettre la formation des cals.



Photo 65 - serres de stratification (Source : Mercier – pépinières viticoles et vignobles).



Photo 66 - caisses de stratification après 14 jours (Source : Mercier – pépinières viticoles et vignobles).

Après acclimatation des assemblages dans une pièce plus tempérée, les greffes soudées sont plantées à l'extérieur, dans une pépinière d'indexage où l'apparition de symptômes est régulièrement observée pendant une période de 2-3 ans. Cette pépinière peut se trouver en plein champ ou sous abri.



Photo 67 - Assemblages juste après plantation en plein champ, au printemps (Source : Mercier – pépinières viticoles et vignobles).



Photo 68 - Pépinière d'indexage en plein champ. Aucun symptôme n'est visible. (Source : Mercier – pépinières viticoles et vignobles).

Des techniques de greffage de tissus herbacés sont appliquées à l'indexage. Pour cela, des pieds-mères des différentes variétés indicatrices sont cultivés sous serre, sur lesquels peuvent être prélevées des boutures herbacées à un oeil. Ces boutures sont greffées sur des boutures herbacées à deux yeux prélevées sur des sarments obtenus par forçage en serre des échantillons de vigne à analyser.

Les boutures herbacées doivent être conservées dans des conditions de forte humidité et assemblées le plus rapidement possible après leur récolte. Les bordures des feuilles les plus grandes sont découpées afin de réduire la surface d'évapotranspiration. La greffe est une greffe en fente qui peut être réalisée manuellement ou bien à l'aide d'une machine à greffer.



Photo 69 - Plant issu de greffe herbacée - Détail du point de greffe (Photo : MAIGRE D., 2004)

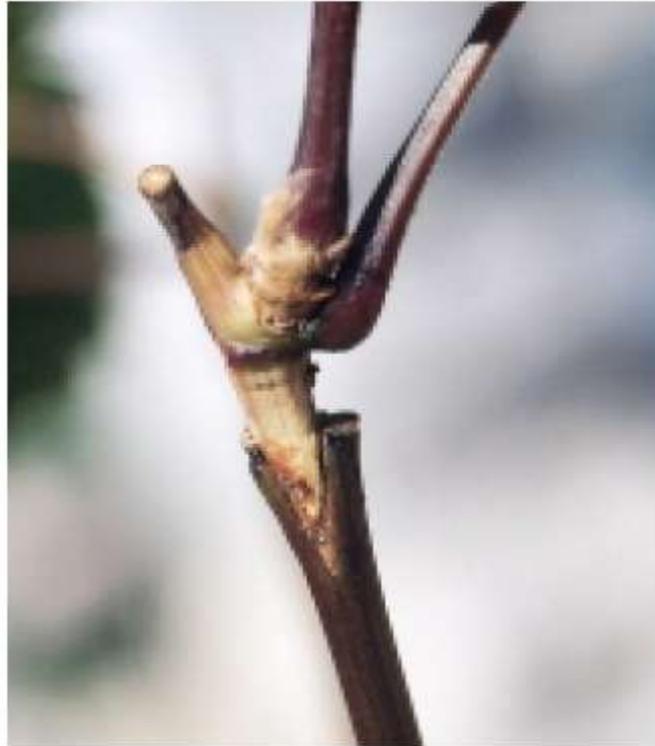


Photo 70 - Plant issu de greffe herbacée - Partie supérieure du plant avec point de greffe. (Photo : MAIGRE D., 2004)

L'état physiologique et les diamètres respectifs des boutures assemblées sont des facteurs déterminants pour la réussite de la greffe herbacée. La greffe est maintenue à l'aide d'une mini pince à linge ou d'un morceau de parafilm. Les assemblages sont piqués dans des pains de laine de roche et traités à l'aide d'un produit fongicide. Ils sont placés dans une enceinte climatique à 28°C en atmosphère saturée d'humidité, soit dans une mini-serre de polyéthylène, soit sous brumisation dans une chambre de culture. Les assemblages sont maintenus en atmosphère saturée d'eau avec une photopériode de 16 à 18 heures, sous une intensité lumineuse initiale de 2 à 3 klux augmentée progressivement jusqu'à 8 klux en 15 jours. Au bout de 3 semaines, les greffes sont bien soudées et les racines sont développées ; les assemblages sont alors adaptés progressivement à la sortie en serre, dans des conditions favorables à l'extériorisation des symptômes (d'après WALTER B. *et al.*, 2000).

Extériorisation et lecture des symptômes

Pour l'indexage traditionnel sur bois aoûtés, les symptômes sont lus habituellement deux fois par an : une fois à la fin du printemps ou début d'été pour les anomalies de croissance (déformation des feuilles et des rameaux, réduction de vigueur, retard de

développement) et les anomalies chromatiques ou nécrotiques du feuillage (panachures, ...) ; et une fois à l'automne pour les défauts de pigmentation des feuilles et, après la chute des feuilles, pour les anomalies sur les bois. En pépinière d'indexage, en plein champ, les symptômes de court-noué apparaissent généralement au cours de la première année de végétation. Pour certains isolats viraux chlorosants, les symptômes ne s'extériorisent qu'en deuxième année après le greffage.



Photo 71 - Symptômes chroniques sur *Vitis rupestris* inoculé avec une source « fanleaf ». (Source : MARTELLI G.-P., 1993)



Photo 72 - Décoloration jaune chrome et déformation des feuilles sur *Vitis rupestris* inoculé avec un greffon présentant des symptômes de mosaïque jaune. (Source : MARTELLI G.-P., 1993)



Photo 73 - Symptômes de choc (anneaux et lignes chlorotiques) sur *Vitis rupestris* inoculé avec une source "fanleaf".
(Source : MARTELLI G.-P., 1993)

A la fin de la période d'indexage (en général 3 ans), les vignes sont arrachées. Le greffon est coupé à 20-25 cm au-dessus de la greffe, les racines sont coupées et la tige principale contenant une partie du greffon et une partie du porte-greffe est pelée pour observer la présence de symptômes du complexe du bois strié, à savoir, stem pitting ou stem grooving. La durée et la forme des symptômes, leur type et leur sévérité sont notés et comparés avec les résultats obtenus avec les contrôles positifs, c'est-à-dire des vignes indicatrices infectées par une maladie particulière connue et cultivées dans les mêmes conditions. Des comparaisons sont également faites avec un témoin négatif, c'est-à-dire une vigne indicatrice saine (MARTELLI G.P., 1993).

Pour l'indexage par la technique de la greffe bouture herbacée, l'extériorisation des symptômes est beaucoup plus rapide. Dans le but de favoriser l'expression des symptômes, les assemblages sont placés dans des pièces de serre ou des chambres climatiques régulées aux températures adéquates. La durée nécessaire à l'apparition des symptômes n'est pas la même pour les différentes viroses : si l'observation des symptômes de la marbrure, de l'écorce liégeuse ou de la mosaïque des nervures peut être faite 20 jours après la soudure de la greffe, il faut 8 mois pour visualiser les symptômes des cannelures sur Kober (Kober stem grooving). Dans le cas du court-noué, si l'indexage est effectué en serre, 3 à 4 semaines après le greffage en vert, à 22-24°C, les symptômes de choc sont des taches, anneaux et lignes chlorotiques, parfois accompagnés de nécroses localisées (Photo 73). Les symptômes chroniques subsistent pendant toute la période végétative et consistent en réduction de croissance et feuilles déformées et dentelées, dans le cas d'isolats viraux déformants (Photo 71). Ces durées d'apparition des symptômes représentent un gain de temps appréciable par rapport aux 12 à 30

mois qui sont nécessaires pour la notation des symptômes en pépinières d'indexage traditionnel avec des bois aoûtés.

Des recherches sont menées pour réduire encore le temps d'apparition des symptômes en utilisant des méthodes de croissance *in vitro*. On peut noter ici qu'une expérience menée par BEN ABDALLAH a donné des résultats intéressants. Ce groupe de travail a utilisé une technique de greffage *in vitro* permettant d'obtenir des symptômes visibles pour les principales viroses de la vigne. Pour la dégénérescence infectieuse, les symptômes apparaissent en moins d'un mois selon cette technique (BEN ABDALLAH F. *et al.*, 2003). Pour l'instant, de telles méthodes ne rentrent pas dans les programmes d'indexage, mais peuvent constituer une voie de recherche intéressante pour l'avenir, notamment en réduisant l'espace nécessaire (pépinières) ainsi que le temps d'apparition des symptômes.

b - Inoculation mécanique à des hôtes herbacés.

L'ArMV et le GFLV peuvent être transmis mécaniquement à de nombreuses espèces végétales en frottant les feuilles de celles-ci avec un extrait de feuilles ou de radicelles de vigne. L'extrait est obtenu en broyant les tissus de vigne dans un mortier, en présence d'un milieu contenant de la nicotine si le tissu est une feuille de vigne, des sels de phosphate si le tissu est une radicelle. La solution obtenue peut être gardée pendant plusieurs mois au réfrigérateur. A priori, tous les tissus vivants d'une vigne infectée peuvent être utilisés pour préparer l'extrait. En pratique, la probabilité que la transmission soit réussie est meilleure avec des tissus jeunes et tendres, c'est pourquoi on utilise les feuilles en développement de l'extrémité des rameaux ou des radicelles (Photo 74).



Photo 74 – Récolte de l'extrémité d'un rameau d'une vigne présentant des symptômes de panachure totale pour la préparation d'un extrait. (Photo G.P. MARTELLI)

Les échantillons ainsi récoltés ne doivent pas être exposés à un soleil fort ou à des températures élevées. Ils sont soit traités directement au laboratoire, soit stockés au réfrigérateur à 4°C. Ce stockage au froid peut durer 2 semaines voir plus si les conditions de récolte et de transport vers le laboratoire ont été optimales. Un stockage prolongé au congélateur à -20°C est possible, mais avec des risques de diminution de la contagiosité de l'extrait pour certains virus, dont les *Nepovirus*. Le passage au congélateur est donc déconseillé pour le dépistage du court-noué.

Les plantes à inoculer sont sélectionnées et leurs feuilles préparées à l'inoculation par un brasage à l'aide d'une poudre minérale.



**Photo 75 - Hôtes herbacés les plus couramment utilisés pour isolés ou mettre en évidence des phytovirus.
 En haut, de gauche à droite : *Nicotiana glutinosa* / *Nicotiana benthamiana* / *Nicotiana clevelandii*.
 En bas, de gauche à droite : *Chenopodium amaranticolor* / *Gomphrena globosa* / *Chenopodium quinoa* (Source :
 MARTELLI G.-P., 1993)**

L'inoculation se fait très simplement en frottant délicatement les feuilles avec un coton-tige imprégné de l'extrait.



Photo 76 - inoculation à un hôte herbacé à l'aide d'un coton-tige. Les traces blanches sur les feuilles sont des restes de poudre abrasive. (Source : MARTELLI G.-P., 1993)

Les feuilles sont ensuite rincées à l'eau chaude. Les plantes inoculées mécaniquement sont cultivées entre 18°C et 26°C pour l'extériorisation des symptômes.

Les hôtes suivants sont utilisés pour le diagnostic du GFLV puisqu'ils développent des symptômes caractéristiques :

- *Chenopodium amaranticolor* et *Chenopodium quinoa* : lésions locales chlorotiques puis nécrotiques, 7 à 10 jours après inoculation, suivies de mosaïque systémique et de déformation des feuilles.



Photo 77 - Panachure systémique induite par le GFLV sur *C. amaranticolor* (Source : MARTELLI G.-P., 1993)

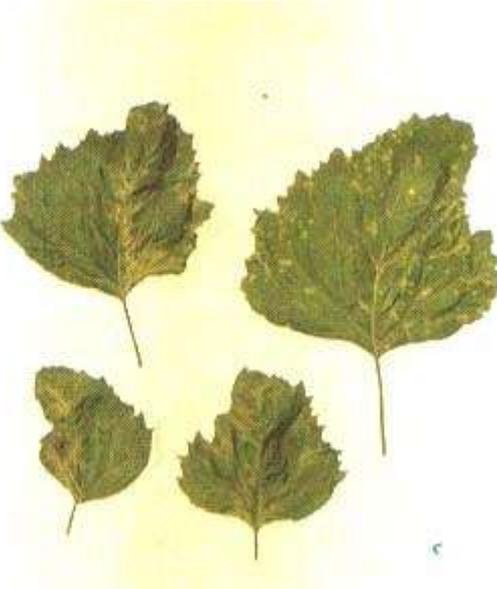


Photo 78 - Panachure systémique et déformatin des feuilles induite par le GFLV sur *C. quinoa* (Source : MARTELLI G.-P., 1993)

- *Gomphrena globosa* : lésions locales chlorotiques, 7 à 10 jours après l'inoculation devenant rouge ultérieurement ; les jeunes feuilles présentent des plages décolorées et de fortes déformations.



Photo 79 – Déformation (torsion) typique des feuilles induite par le GFLV sur *Gomphrena globosa* (Source : MARTELLI G.-P., 1993)

- *Nicotiana benthamiana* : petites lésions chlorotiques, marbrure et déformation des feuilles.

L'ArMV induit des symptômes semblables à ceux provoqués par le GFLV sur les mêmes hôtes herbacés. Cependant, *Nicotiana glutinosa*, qui n'est pas utilisé pour le GFLV, est un indicateur intéressant dans le dépistage de l'ArMV.



Photo 80 - Mosaïque induite par l'ArMV sur *C. quinoa* (Source : MARTELLI G.-P., 1993)



Photo 81 - Taches et anneaux chlorotiques induits par l'ArMV sur *Nicotiana glutinosa*. (Source : MARTELLI G.-P., 1993)

c - Méthodes immunologiques

Les méthodes immunologiques sont basées sur le pouvoir immunogène des particules virales. Il existe trois grandes techniques immunologiques de détection des virus du courtonoué : l'immunoprécipitation, la méthode ISEM et la méthode ELISA. Après avoir expliqué très rapidement le principe des deux premières nous détaillerons plus précisément le test ELISA puisqu'il est, à l'heure actuelle, l'examen diagnostique de routine le plus utilisé.

i - Immunoprécipitation

Il s'agit ici de constater la formation d'un précipité qui se forme lorsqu'une quantité adéquate d'antigènes et d'anticorps sont en contact. Les réactions de précipitation peuvent avoir lieu dans un milieu liquide ou dans un gel d'agarose. L'immunoprécipitation en milieu liquide est utilisée pour les particules virales trop longues pour diffuser dans un gel d'agar (500 nm et plus) ou quand les 2 réactifs (l'anticorps et l'antigène) sont initialement mélangés. On utilise les gels d'agar pour les particules virales plus petites (inférieures à 300nm de long) et quand les réactifs sont initialement séparés. Ils migent alors l'un vers l'autre dans le gel d'agar et forment un précipité visible à leur lieu de rencontre. Il existe une extension de cette méthode appelée double immunodiffusion qui permet d'introduire dans les puits une solution d'antigène témoin et une solution d'antigène à caractériser. Par cette technique, on peut confirmer l'identité du virus au témoin, ou au contraire en définir un nouveau sérotype grâce à l'observation des figures de raccordement des arcs de précipitation. Il existe de multiples déclinaisons de l'immunoprécipitation faisant intervenir des quantités d'antigènes plus ou moins importantes et des milieux réactionnels différents.

ii - ISEM (Immunosorbent Electron Microscopy) ou IEM (Immunoélectromicroscopie).

Le principe de l'Immunosorbent Electron Microscopy est basé sur le piégage sélectif des virus sur la lame du microscope électronique. Celle-ci est couplée à un réseau retenant les anticorps d'un antisérum spécifique. Cette technique a été décrite dans de nombreuses publications à partir du milieu des années 70. Le consensus est que l'ISEM est une technique très fiable (théoriquement sans faux positif), aussi sensible que la méthode ELISA, rapide (les résultats sont souvent obtenus en 1 à 2 heures) et facile à utiliser. De plus, elle a l'avantage de permettre de visualiser donc localiser la réaction antigène-anticorps et de détecter par conséquent la présence de plusieurs types de particules dans un même extrait. Ceci est particulièrement utile pour la mise en évidence des infections complexes. L'ISEM trouve cependant ses limites car elle nécessite de posséder un microscope électronique et elle n'est pas appropriée pour les tests de routine à grande échelle.

iii - ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

ELISA est utilisé aujourd'hui pour les analyses de routine pour la détection de l'ArMV et du GFLV dans le cadre de la sélection sanitaire. C'est pourquoi nous allons

détailler ce test qui, aujourd'hui, est pratiqué par tous les laboratoires qui font du dépistage de virose sur vigne.

Principe :

La technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

Avantages de la technique en général :

- L'utilisation d'anticorps monoclonaux rend la détection très spécifique.
- Possibilité de quantifier grâce à la réalisation d'une gamme en parallèle.
- L'utilisation d'anticorps secondaires rend la technique sensible.
- technique accessible à tous les biologistes.
- La détection du signal ne nécessite pas la présence d'appareillage spécialisé.
- La validité des trousseaux est d'environ 1 an.

Inconvénients de la technique :

- La réaction enzymatique rend cette technique dépendante de la température, du pH et de l'éclairement.

Le test ELISA indirect :

Il se réalise en 4 étapes :

La première étape appelée « coating » de l'antigène :

Elle consiste à incuber dans des puits la solution d'antigène spécifique de l'anticorps recherché. La fixation de l'antigène sur le fond des puits se fait électrostatiquement. Les plaques sont incubées à 4°C pendant une nuit. Les puits sont ensuite lavés pour éliminer les antigènes en excès avec du tampon de lavage.

La deuxième étape consiste à fixer l'anticorps à doser :

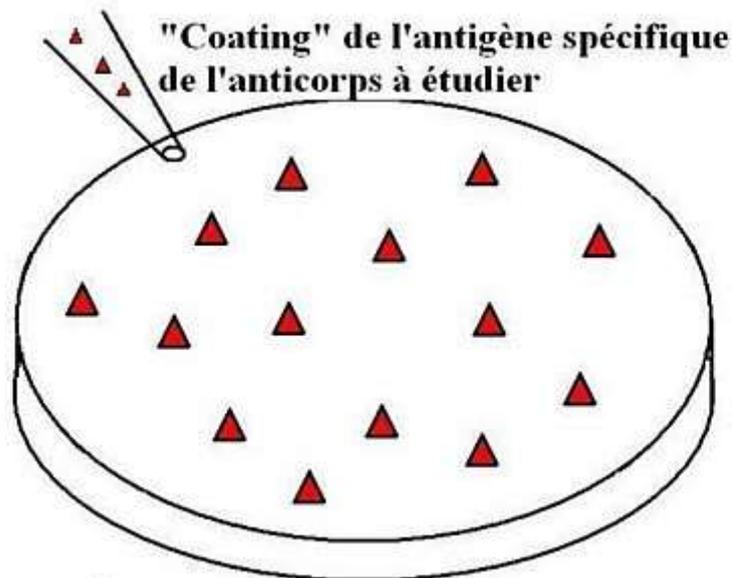
On incube à 37°C dans les puits, la solution d'anticorps à doser pendant environ 30 minutes à 2 heures. Les anticorps se fixent spécifiquement sur l'antigène. Les puits sont ensuite lavés pour éliminer les anticorps à doser en excès avec du tampon de lavage.

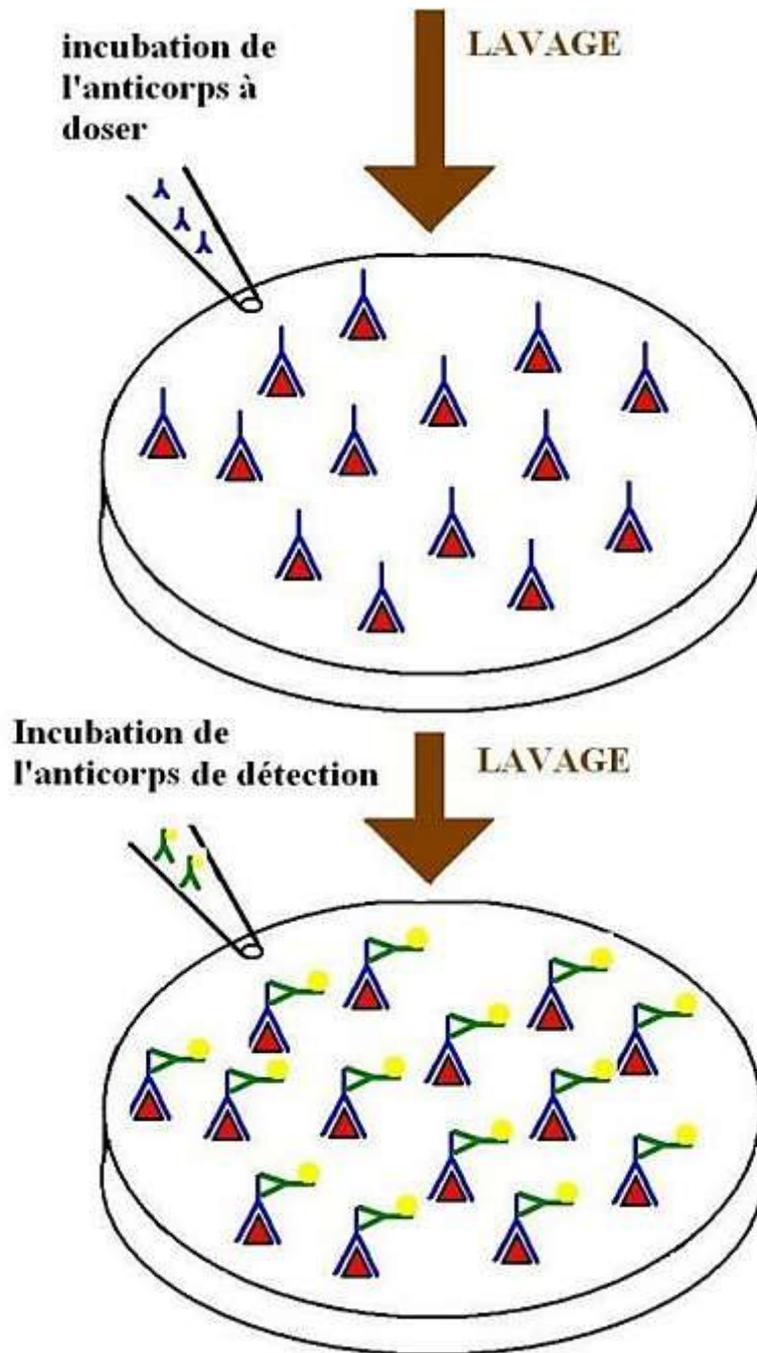
La troisième étape consiste à fixer l'anticorps de détection :

On incube à 37°C dans les puits, la solution d'anticorps de détection pendant environ 30 minutes à 2 heures. Les anticorps de détection se fixent spécifiquement sur les anticorps à doser. Les puits sont ensuite lavés pour éliminer les anticorps de détection en excès avec du tampon de lavage. Notons que les anticorps de détection sont couplés à une enzyme qui, en présence de son substrat le transforme en produit de réaction détectable et mesurable grâce à l'apparition d'une coloration.

La quatrième étape consiste à révéler les anticorps fixés :

On incube à température ambiante et à l'obscurité pendant 10 minutes, une solution révélatrice contenant le substrat de l'enzyme. L'apparition d'une coloration dans le substrat indique la présence d'anticorps à doser. L'intensité de celle-ci est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration d'anticorps recherché.





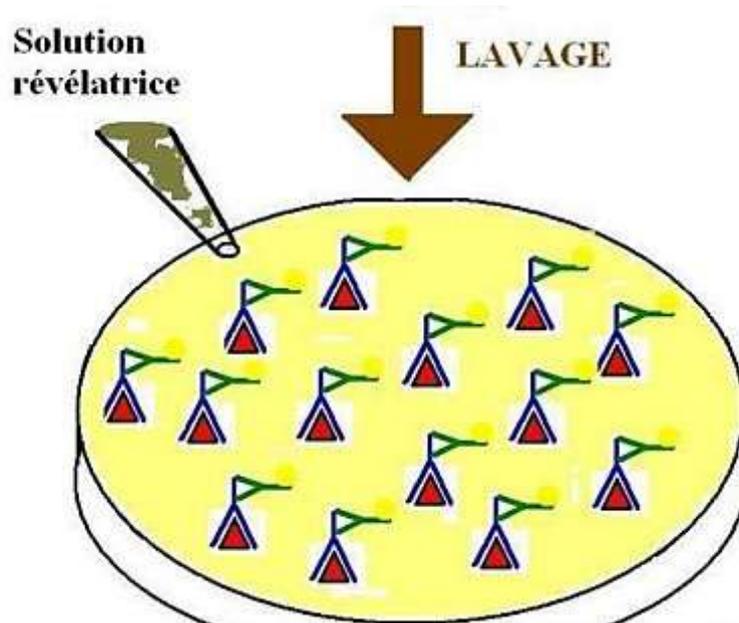


Figure 18 : test ELISA indirect (MAGNIEZ F., 2008)

L'illustration ci-dessus présente un test ELISA indirect. Le principe du test ELISA direct est exactement le même mais l'anticorps spécifique de l'antigène à mettre en évidence est couplé à l'enzyme. Il est donc à la fois l'anticorps à doser et l'anticorps de détection.

Le DAS ELISA direct ou *Double Antibody Sandwich ELISA* direct:

Le protocole ELISA qui est utilisé le plus souvent est appelé ELISA sandwich à 2 anticorps (DAS-ELISA). Dans ce cas de figure, l'antigène se trouve entre 2 anticorps spécifiques. L'utilisation de la DAS-ELISA nécessite de posséder 2 anticorps (monoclonaux) reconnaissant des épitopes différents sur l'antigène.

La première étape consiste à fixer sur le support, l'anticorps de capture. On incube la solution à 37°C pendant 2 heures puis lavage ou une nuit à 4°C puis lavage.

Lors de la deuxième étape, on dépose l'échantillon possédant l'antigène à identifier qu'on laisse incuber à 37°C pendant 2 heures puis lavage ou une nuit à 4°C puis lavage.

Dans une troisième étape, on fixe l'anticorps de détection marqué avec une enzyme (phosphatase alcaline) sur l'antigène recherché. L'anticorps de détection est encore appelé

« un conjugué » puisqu'il correspond à l'association d'un anticorps et d'une enzyme. Pour cela, on dépose la solution d'anticorps dans les puits puis on incube l'ensemble à 37°C pendant 2 heures.

Dans la dernière étape, on dépose une solution révélatrice contenant le substrat enzymatique (para-nitrophénylphosphate) et on laisse incuber pendant 30 à 120 minutes. Le produit de réaction obtenu est soluble et coloré. L'intensité de cette coloration peut être mesurée à l'aide d'un photomètre.

Il existe différentes variantes à ce protocole. Dans le protocole TAS-ELISA à trois anticorps, les antigènes sont révélés à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris spécifique de l'antigène ; la présence de cet anticorps est ensuite révélée à l'aide d'un conjugué phosphatase-anticorps de chèvre anti-souris. Parfois le protocole DAS-ELISA est précédé d'une étape de fixation de protéine A qui est très affine de la partie Fc (fragment constant) des immunoglobulines.

Enfin, la réponse ELISA peut être amplifiée en utilisant pour la détection de l'antigène un conjugué anticorps-biotine qui est ensuite détecté à l'aide d'un deuxième conjugué phosphatase-avidine. La biotine (vitamine H) a une très forte affinité pour l'avidine, glycoprotéine extraite du blanc d'œuf. Ce test porte le nom de DAS-ELISA indirect.

La sensibilité du test DAS-ELISA direct se situe entre 1 et 10 ng/ml. Cette sensibilité peut être augmentée par l'utilisation du système indirect du fait de la forte affinité entre la streptavidine et la biotine.

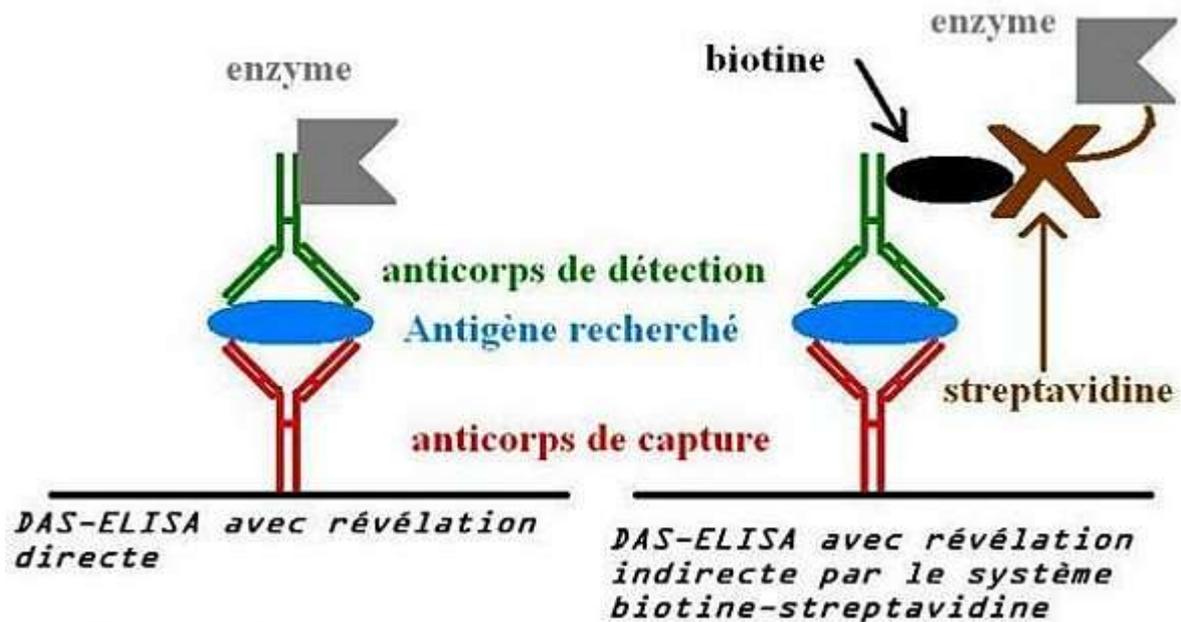


Figure 19 : test DAS-ELISA direct (droite) et indirect (gauche). (Source : MAGNIEZ F., 2008).

Application au domaine du dépistage des phytovirus sur vigne :

Les principaux avantages de l'analyse ELISA dans ce domaine sont les suivants :

- Une grande sensibilité, permettant de détecter des virus en concentrations aussi faibles que 1 à 10 ng/ml
- La rapidité du protocole qui peut être réalisé en 6 à 48 heures.
- L'automatisation de la plupart des étapes permettant d'analyser des séries d'échantillons en grands nombres
- La possibilité de rechercher les virus dans des extraits bruts provenant de petits échantillons de divers organes de vigne (feuilles, sarments, racines) et ne nécessitant pas de manipulation importante
- La disponibilité sur le marché de kits de dépistage contenant les réactifs spécifiques pour la détection des principaux virus de la vigne (*Nepovirus*, *Closterovirus*, virus de la marbrure, GVA, GVB)
- Un coût peu élevé
- La possibilité de standardiser les conditions du test et donc d'harmoniser les protocoles entre les différents laboratoires d'analyse.

Cependant, les analyses de routine pour le dépistage des virus de la vigne par ELISA nécessitent certaines précautions. Des erreurs peuvent provenir de confusions dans les prélèvements des échantillons, leur étiquetage, leur acheminement et leur conservation. D'autres erreurs peuvent être dues à une mauvaise qualité des réactifs : dans certains cas, l'utilisation d'anticorps monoclonaux apporte des améliorations en sensibilité mais aussi en spécificité des réactions. Pour les analyses de routine, les questions les plus critiques sont les suivantes : Quel organe faut-il prélever sur la vigne à analyser? Quand le prélèvement peut-il être fait? Quelle est la meilleure base d'échantillonnage dans une parcelle, une pépinière ou un lot de plants greffés soudés?

Il faut souligner que la sensibilité élevée d'ELISA rend possible le groupage en une seule analyse de fragments d'organes de vigne pour le dépistage des Nepovirus ou des Closterovirus : par exemple, on peut regrouper de manière confortable une vingtaine de fragments de feuilles différentes pour la détection du GFLV. Par contre, comme la répartition des virus dans la vigne n'est pas toujours homogène, il est recommandé de prélever plusieurs échantillons de feuilles ou de bois sur la même vigne soumise à analyse.

Le test ELISA pour le dépistage du court-noué de la vigne

Rappelons tout d'abord qu'aujourd'hui le test ELISA est le plus utilisé pour les analyses de routine pour la détection de l'ArMV et du GFLV, que ces analyses soient faites dans le cadre de la sélection sanitaire, ou pour des dépistages demandés par les viticulteurs.

Des réactifs polyclonaux ou monoclonaux peuvent être employés. Certains de ces réactifs sont disponibles sur le marché, ce qui facilite les tests. Les bourgeons de vigne, les racines, les feuilles et le bois peuvent servir pour les analyses. Les feuilles les mieux adaptées au dépistage viral sont de jeunes feuilles prélevées au printemps, avant les périodes chaudes de l'été quand l'ArMV et le GFLV ne sont plus toujours détectables (cf tableau 7). On peut analyser des copeaux obtenus en raclant le bois avec un scalpel ou une lame de rasoir, après avoir détaché l'écorce de sarments fraîchement récoltés ou conservés au froid. Des disques peu épais découpés dans des sarments peuvent aussi être utilisés (WALTER B. *et al*, 2000).

Date	<i>V. vinifera</i> Chardonnay	<i>V. berl</i> x <i>V. riparia</i> Kober 5BB
30 mai	[4]	[5]
30 juin	[3]	[5]
22 juillet	[1]	[4]
18 août	Non détectable	[4]
27 août	[2]	[5]
1er octobre	[2]	[5]
23 octobre	[2]	[5]

Tableau 7 : Variation de la réponse ELISA pour le dépistage du GFLV dans de vignes en fonction de la date de prelevement des échantillons des feuilles dans les conditions climatiques de Colmar. (d'après WALTER B. *et al.*, 2000).

Les chiffres sont les dilutions limites qui permettent encore de détecter le virus ; un échantillon de 0,5 g de feuille est broyé dans 5ml de tampon = dilution 10^{-1} [1], puis l'extrait est dilué de 10 en 10 : [2] = 10^{-2} ; [3] = 10^{-3} ; [4] = 10^{-4} ; [5] = 10^{-5} .

d - Détection à l'aide d'outils moléculaires

Les méthodes qui permettent de détecter le (ou les) acide(s) nucléique(s) viraux dans des extraits de vigne nécessitent, pour la plupart, la connaissance de séquences de cet (ces) acide(s) nucléique(s) à partir desquelles on peut synthétiser des sondes. Trois types de méthodes sont utilisées pour le dépistage de virus de la vigne : l'identification de formes répliquatives ARN double brin ; l'hybridation d'acides nucléiques et la réaction de polymérisation en chaîne (PCR = Polymerase Chain Reaction).

i - Identification d'ARN double brin (ARNdb)

Les ARNdb sont des formes répliquatives des ARN viraux simple brin de polarité positive qui s'accumulent dans les tissus infectés. Ils sont donc constitués d'un brin de polarité positive et du brin complémentaire de polarité négative. Ce sont des complexes moléculaires stables dont la taille est de deux fois celle des ARN génomiques qui peuvent être extraits des tissus infectés. Leur détection dans des extraits de plante signe une infection virale (MARTELLI G.P., 1993). L'extraction et la purification des ARN db sont assez complexes et

se font à partir d'une quantité relativement importante de tissus (2 à 10g). En estimant la taille relative des ARNdb, il est possible d'identifier, avec une bonne approximation, le groupe taxonomique auquel le virus appartient. La caractérisation des ARN db se fait en fonction de leur vitesse de migration sur gel d'électrophorèse. Cependant, l'identification spécifique de virus n'est pas possible. Il a été mis en évidence, à partir de tissus phloématiques de vigne, des ARN db caractéristique de virus associés à l'enroulement (WALTER B. *et al.*, 2000). Cependant, la difficulté des méthodes d'extraction/purification et la caractérisation par électrophorèse en font un protocole inadapté à des analyses virologiques de routine en grand nombre. Par contre, l'analyse des ARN db peut être un moyen de vérification non spécifique de l'absence de toute contamination par ces genres de virus. Ce type d'analyse peut être utile dans une station de quarantaine ou bien pour vérifier l'efficacité d'un traitement visant à éliminer des virus par la chaleur ou par culture de méristèmes (cf. thérapie ou culture *in vitro*). A l'heure actuelle, l'identification d'ARN double brin, bien qu'applicable aux *Népovirus*, ne fait pas partie des méthodes appliquées au dépistage de ces viroses, ou de manière très anecdotique.

ii - Hybridation d'acides nucléiques

L'étude de la structure du génome des phytovirus et la connaissance des séquences pour certains d'entre eux, dont les virus du court-noué, a permis d'appliquer les techniques d'hybridations moléculaires au diagnostic. Ces techniques ont donné naissance à des tests de détection particulièrement sensibles qui utilisent des sondes génomiques spécifiques du virus. Leur principe est basé sur la formation d'une molécule d'acide nucléique double brin (duplex) obtenue par hybridation entre une molécule cible représentée par un fragment de la séquence du génome viral et une molécule sonde constituée par un acide nucléique complémentaire (ADNc ou ARNc) de cette séquence. La principale difficulté réside dans le choix de la séquence cible, dont dépendra la spécificité du test (problème similaire à celui du choix des anticorps monoclonaux pour ELISA) et dans la construction de la sonde qui devra être clônée dans un plasmide recombinant puis intégrée dans une bactérie compétente. La mise en évidence du duplex est assurée grâce au marquage de la sonde soit par un élément radioactif « chaud » (P^{32}), soit par un marqueur « froid » comme la biotine, l'acétyl-aminofluorène (AAF), la cytosine fluorée et la digoxigénine.

Le test en lui-même est rapide et d'exécution relativement facile. Les échantillons à tester sont déposés sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon (test de type *Dot-Blot*).

Après cuisson à 80°C ou fixation aux rayons UV, les membranes peuvent être conservées avant d'être analysées. Le test peut aussi être réalisé par Northern Blot ou Southern Blot, consistant à isoler les duplex par électrophorèse. Le Northern Blot et le Southern Blot sont des techniques de migration par électrophorèse semblables, la différence étant les molécules que l'on fait migrer : ADN pour le Southern Blot et ARN pour le Northern Blot. La sonde d'hybridation peut être faite indifféremment d'ADN c ou d'ARN c dans les deux méthodes de transfert.

Les premières applications de l'hybridation à la détection de virus de la vigne étaient faites avec des sondes marquées à l'aide d'un élément radioactif. Aujourd'hui, l'utilisation de sondes froides permet de détecter des quantités très faibles de virus (quelques picogrammes) à partir de 100 mg de tissus de vignes infectées par le GVA, le GVB ou des GLRaVs. Des sondes ADNc ont été utilisées avec succès pour détecter le GFLV dans des extraits totaux d'acides nucléiques de vigne par Northern Blot et Dot Blot.

iii - PCR (Polymerase Chain Reaction)

Les premières techniques d'amplification enzymatique des acides nucléiques sont apparues en 1983. Adaptées depuis les années 90 à la détection des virus des plantes, elles constituent une nouvelle révolution dans le domaine du diagnostic.

La technique d'amplification enzymatique *in vitro* permet de copier spécifiquement de façon exponentielle une partie ou la totalité d'un acide nucléique viral se trouvant dans un mélange grâce à la reconnaissance et à l'hybridation de courtes séquences complémentaires (amorces) et à l'action d'une ADN-polymérase thermostable (Taq polymérase). Ceci rend possible la détection de la séquence virale ainsi amplifiée mais aussi sa caractérisation précise par séquençage.

Dans le cas des virus du court-noué qui sont des virus à ARN, il est nécessaire d'inclure, avant la réaction d'amplification proprement dite, une étape préalable de transcription inverse (RT = Reverse Transcriptase) au cours de laquelle l'ARN est copié en ADNc par une transcriptase inverse (RT-PCR). Les deux étapes (transcription et amplification) peuvent être conduites séparément ou simultanément dans un seul tube. La préparation de l'échantillon est une étape critique car les extraits de vignes peuvent contenir des inhibiteurs des réactions enzymatiques. Il faut adapter en conséquence le protocole d'extraction ou de purification des acides nucléiques (ALBOUY J. et DEVERGNE J.C., 1998) (ASTIER S. *et al.*, 2001). Les premiers essais d'application de la PCR à la détection de

virus de la vigne étaient réalisés sur des acides nucléiques obtenus après l'extraction à l'aide de phénol à partir de feuilles de vigne. Ce protocole a été simplifié par la suite, en utilisant des extraits dilués de tissus de vigne ou bien en appliquant la PCR sur des particules virales retenues à l'aide d'anticorps spécifiques (immunocapture = IC-PCR ou IC-RT-PCR). Une méthode efficace d'extraction d'ARNs de bonne qualité à partir de tissus de vigne sans phénol, ni solvant organique, ni alcool consiste à éliminer avec des mini-colonnes les polysaccharides et composés phénoliques qui peuvent interférer avec la réaction PCR. Ce protocole a été appliqué avec succès pour le dépistage des GFLV, ArMV, et GLRaV-3 dans des vignes. Une simplification importante a été apportée par la mise au point de protocoles PCR dans lesquels un pétiole de feuille est écrasé directement sur une membrane de nylon afin d'en extraire le jus. L'ARN viral est ensuite solubilisé et amplifié par PCR. La membrane peut être conservée pendant plus d'un mois avant que le test ne soit réalisé (WALTER B. *et al.*, 2000).

Ces dernières années de nombreux protocoles visant à améliorer le dépistage par PCR sont proposés. Par exemple, en 2001, le laboratoire de Génie Biologique de l'Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie de Tunis propose une méthode simple, sensitive et spécifique de capture des RNA du GFLV par des oligosondes fixées sur des membranes de nylon. Cette fixation est suivie d'une RT-PCR. La méthode est 10 fois plus sensible qu'une IC-RT-PCR pour le GFLV. De plus, les sondes immobilisées sur la membrane sont réutilisables sans perte d'efficacité, ce qui pourrait en faire une technique utilisable en routine dans le dépistage du GFLV (FATTOUCH S. *et al.*, 2001).

Plusieurs virus différents peuvent être détectés simultanément dans une seule réaction en utilisant plusieurs jeux d'amorces spécifiques (multiplex PCR). La sensibilité et la spécificité du test PCR dépendent du choix des amorces, des températures d'hybridation et d'élongation et du nombre de cycles. En effet, si l'on souhaite un test spécifique d'une espèce ou d'une souche virale, les amorces seront choisies dans une région variable ; si au contraire on souhaite reconnaître plusieurs virus d'une même famille ou d'un même genre, les amorces seront choisies dans une région du génôme conservée au niveau de la famille ou du genre (même avec de légère modification de séquences nucléotidiques). Dans la pratique, vue l'extrême sensibilité de cette technique, il y a lieu de rester attentif à ne pas sous-estimer la variabilité potentielle du virus. Ainsi, dans une publication de 2006, l'Institut Agronomique Méditerranéen de Bari (IAMB) propose un protocole développant des amorces dégénérées et spécifiques d'espèces pour la détection différentielle et simultanée par RT-PCR des *Nepovirus*

des sous-groupes A, B et C infectant la vigne. Trois sets d'amorces dégénérées ont été développés, 1 pour chacun des 3 sous-groupes. Leur efficacité a été prouvée pour la détection de chaque sous-groupe dans des vignes infectées et des hôtes herbacés. Pour le sous-groupe A qui nous intéresse, les amorces créées amplifient un fragment de 255 pb d'échantillons infectés par le GFLV, l'ArMV, le TRSV et le GDeFV, mais ne génèrent pas de produits d'amplification pour les échantillons infectés par les autres espèces de *Nepovirus* (DIGIARO M. *et al.*, 2007). Cet exemple permet de mieux comprendre que la PCR peut permettre de dépister ce que l'on veut (d'un isolat viral à un groupe de virus) dans la mesure où l'on arrive à synthétiser la sonde adéquate. Une autre étude, allemande, fait état d'une méthode de RT-PCR pour la détection et la différenciation simultanée de l'ArMV et du GFLV dans des vignes avec une simple paire d'amorces. La méthode est 10 fois plus sensible que les tests ELISA correspondants. La différenciation entre ArMV et GFLV est possible grâce à un site de restriction présent sur les produits d'amplification des isolats de GFLV et non retrouvé pour les produits d'amplification des souches d'ArMV (WETZEL T. *et al.*, 2001).

La visualisation des produits de l'amplification est couramment obtenue par l'observation des bandes séparées par électrophorèse en gel d'agarose et colorées au bromure d'éthidium (BET). Cependant, la mise au point de techniques de détection des produits d'amplification par colorimétrie permet d'obtenir non seulement un gain de sensibilité mais aussi une simplification appréciable pour les analyses de nombreux échantillons et l'adaptation à la pratique de routine. Des techniques récentes permettent de ne plus utiliser les migrations en gel d'électrophorèse qui diminuent l'efficacité du test. En effet, les dépistages du court-noué par PCR s'orientent aujourd'hui vers des méthodes de RT-PCR dont la révélation se fait en temps réel (ttes biblio SD). Nous pouvons citer par exemple le protocole « real-time Taq Man® RT-PCR ». Ce protocole Taq Man ou fluorogenic 5'-nuclease améliore encore les méthodes « temps réel ». Il utilise une nouvelle génération de produits pour la détection. Durant l'amplification l'amorce Taq Man® à double fluorescence est clivée par la Taq polymérase, séparant la molécule fluorescente. Ceci résulte en une augmentation de la fluorescence détectable à chaque cycle, correspondant à la quantité de produit amplifié. Cette fluorescence est mesurable en temps réel.

Une étude publiée en 2008 par le département de pathologie végétale de l'université de Californie décrit une nouvelle approche offrant encore plus d'issues. Cette méthode est appelée Low-density arrays (protocole basse-densité). Elle a été développée en asséchant les

complexes amorces/sondes et en les fixant sur des plaques. Les échantillons a testé passent sur ces plaques, ce qui permet la quantification d'un grand nombre de gènes viraux cibles (génomés viraux) en une opération. Dans cette étude, le potentiel de la LDA (Low Density Arrays) a été étudié pour la détection de 13 virus de la vigne dans des tissus infectés. Cette étude est la première du type à ce jour et ouvre encore de nouveaux horizons dans l'amélioration de la rapidité, la sensibilité, la reproductibilité et la facilité d'utilisation des tests de dépistage (OSMAN F. *et al.*, 2008).

En conclusion sur les méthodes PCR, on peut dire que des protocoles sont utilisés avec succès pour le dépistage des virus du court-noué ainsi que la plupart des virus importants de la vigne. Leur sensibilité est généralement 10 à 100 fois supérieure à celle des ELISA, voir 100 à 1000 fois d'après certaines sources (OSMAN F. *et al.*, 2008). Cependant, leur mise en œuvre nécessite beaucoup de précautions et de contrôles (témoins) afin d'éviter l'apparition de réactions parasites pouvant aboutir à l'estimation de faux positifs. De plus, pour les protocoles RT-PCR classiques (pas en temps réel) la mise en évidence des fragments amplifiés par électrophorèse sur gel d'agarose est une manipulation assez lourde qui n'est pas adaptée à des analyses en grand nombre.

e - Conclusion sur les méthodes de dépistage de la maladie

Reprenons une synthèse faite par Bernard WALTER qui compare les différentes méthodes de dépistage des virus de la vigne en listant les avantages et inconvénients de chacune.

- L'observation des symptômes sur la vigne est immédiate et informe sur la virulence du virus ; cependant elle ne décèle pas les infections latentes et peut prêter à confusion (cf symptômes)
- L'inoculation mécanique à des hôtes herbacés est rapide (10 à 15 jours) et permet de révéler les infections latentes sur la vigne ; la méthode est assez lourde et ne donne pas d'information sur la virulence du virus sur la vigne.
- L'indexage par greffage sur des variétés indicatrices de vigne est une méthode sensible qui révèle des infections latentes et donne des informations sur les effets pathologiques ; mais la méthode est coûteuse

et longue, même si le greffage en vert permet de ramener la durée de l'indexage de quelque mois à quelques semaines.

- ELISA est rapide (6-48 heures), fiable, sensible et peu coûteux ; cependant son résultat n'est pas relié à l'effet pathogène du virus détecté
- PCR est la méthode de détection de virus la plus sensible ; son application doit encore être simplifiée pour la routine.

Au fur et à mesure que les connaissances augmentent sur l'identité des virus et leur structure moléculaire (séquençage du génôme), les tests de laboratoire remplacent petit à petit les indexages biologiques, bien que les agréments des clones se fassent encore par indexage. ELISA reste pour l'instant une méthode de choix par son faible coût et sa faisabilité en routine et est la méthode la plus utilisée par les laboratoires. A l'heure actuelle, nous pouvons dire que le diagnostic est indispensable non seulement pour les évaluations épidémiologiques, mais aussi pour la mise en oeuvre de la seule stratégie de lutte aujourd'hui efficace : la sélection sanitaire. De plus, la branche diagnostic visant à étudier le potentiel virulifère des vecteurs est également primordiale pour limiter la diffusion des viroses en contrôlant leurs vecteurs naturels (lorsque ceux-ci sont connus). La conclusion est donc que le dépistage est la première étape, fondamentale, pour mettre en oeuvre les moyens de lutte aujourd'hui disponibles contre le court-noué.

C - Méthodes de lutte

1 - La sélection sanitaire

La sélection sanitaire est l'un des volets de la sélection clonale de la vigne, complémentaire à la sélection pomologique (sélection génétique). En France, la « Section de Sélection et de Contrôle des Bois et Plants de Vigne » fut créée en 1946 pour procéder à l'immatriculation des producteurs de bois de multiplication (porte-greffes et greffons) et des pépiniéristes. C'était le début de la sélection sanitaire qui portait alors sur la seule maladie à virus connue en France : le court-noué. Initialement la sélection était visuelle et très sévère : toute parcelle fortement infectée par le court-noué était arrachée. Puis, au lieu d'éliminer les

ceps malades la sélection se basa sur une discrimination positive, choisissant les ceps vigoureux et productifs exempts de symptôme de virose. En France, à l'heure actuelle, la sélection sanitaire est appliquée de manière rigoureuse. Elle est régie par des mesures directives relatives à la région EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) ou OEPP (en français) dont la France fait partie. Cette organisation est composée d'experts venant de différents pays membres investis dans la production de matériel de plantation sain (ROY A.S., 2003). Plusieurs organisations de ce type gèrent les programmes de certification et d'importation et exportation de matériel végétal. Nous pouvons citer par exemple la NAPPO (North American Plant Protection Organization) qui a la gestion des états membres d'Amérique du nord (Canada, Etats-Unis et Mexique) (JOHNSON R.C., 2003). L'Australie est également très pointue dans le domaine et gère très rigoureusement les programmes de certification et d'importation de matériel végétal. Ce pays possède également un conservatoire national de conservation des clones très important : The Australian National Nuclear Grapevine Collection. Parmi les grands pays producteurs de vin on peut également citer l'Afrique du sud qui possède également son propre mode de gestion des clones (OOSTHUIZEN W.T. et VAN RENSBURG N., 2003). La Nouvelle Zélande possède un fonctionnement atypique puisqu'elle ne possède pas d'organisation gouvernementale de gestion de la sélection clonale et sanitaire. Ce manque de contrôles phytosanitaire a provoqué la dispersion à grande échelle de matériel de propagation infecté, notamment du matériel infecté par le GLRaV-3. En l'absence de schémas nationaux pour l'industrie néo-zélandaise, il a été développé un schéma de certification privé basé sur le HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) (BONFIGLIOLI R. *et al.*, 2003). Nous comprenons donc qu'il n'existe pas de consensus international et que chaque groupe de pays, pays ou régions possèdent des schémas de certification différents.

Revenons aux pays de la région OEPP. Cette organisation regroupe 50 pays (figure 20).



Figure 20 - Pays appartenant à la région OEPP

Elle a pour but de produire des schémas de certification pour la production de fruits de grande importance économique pour les régions européennes et bordant la méditerranée. Ces schémas décrivent les étapes à suivre pour la production de matériel végétal de propagation (différentes variétés et porte-greffes). Ils incluent également les marches à suivre pour les procédures de dépistage des différents virus ou agents virus-like qui doivent être testés. Il est important de noter ici que les virus recherchés ne sont pas forcément les mêmes en fonction des différents pays du monde, suivant les directives auxquelles ils répondent. Pour préciser ce que sont les normes OEPP se reporter à l'annexe « normes OEPP » à la fin de la thèse.

a - Sélection clonale

La sélection clonale a pour but de sélectionner et de propager, pour un cépage donné, les clones les mieux adaptés aux contraintes qualitatives et productives. Parmi les critères de sélection figure l'état sanitaire vis-à-vis des viroses les plus dommageables. L'IFV (Institut Français de la Vigne et du Vin) donne la définition suivante d'un clone de vigne : « un clone est la descendance végétative conforme à une souche choisie pour son identité indiscutable, ses caractères phénotypiques et son état sanitaire ».

La sélection clonale se divise en deux volets, la sélection sanitaire et la sélection génétique. La sélection clonale est réalisée selon une procédure précise faisant appel à un savoir-faire et à du matériel et des techniques qui ont été développés à l'ENTAV depuis 1962 et qui continuent de l'être par l'IFV et ses partenaires. Pour comprendre comment se réalise la sélection sanitaire des plants en France, il est important de présenter brièvement l'institution qui en a la charge. L'Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV) émane de la fusion, en

2007, des deux instituts techniques nationaux au service de la filière viti-vinicole : l'Etablissement National Technique pour l'Amélioration de la Viticulture (ENTAV) et l'Institut Technique de la Vigne et du Vin (ITV France). Le siège de l'Institut Français de la Vigne et du Vin se situe au Domaine de l'Espiguette, au Grau du Roi dans le Gard, où est exploité un vignoble d'une quarantaine d'hectares, conservatoire national des variétés et des clones de vigne et parcelles de pré-multiplication nécessaires à la diffusion de la sélection végétale française. L'Institut national dispose également de sites expérimentaux présents dans l'ensemble des bassins viticoles. Ces sites sont équipés de parcelles expérimentales, de halles technologiques, de chais pour mini-vinifications et de laboratoires d'analyses. Les principaux objectifs de l'IFV sont d'améliorer le potentiel du matériel végétal viticole tout en maintenant l'ensemble des caractéristiques et l'identité de chaque variété. L'IFV contribue à la conservation de l'ensemble des variétés de vignes cultivées en France tant par la qualité sanitaire des plants, qu'à travers la prise en compte de la diversité des cépages et des types de vins.

Le centre de sélection de l'IFV occupe environ 80 hectares. Ce site a été choisi pour le conservatoire national des clones car ses sols sont constitués uniquement de pur sable méditerranéen, ne contenant ni phylloxéra ni nématodes vecteurs du court-noué.

Plus de 38 ha sont plantés en collections de clones, parcelles de prémultiplication et multiplication auxquels s'ajoutent les pépinières. Les installations sont composées d'un ensemble de bâtiments comprenant :

- les locaux d'exploitation, des ateliers de débouturage, de greffage, des enceintes frigorifiques, des chambres climatiques pour la stratification,
- des serres pour l'indexage, la culture hors-sol et la multiplication herbacée. La surface totale de serres et de tunnels dépasse 5 000 m².
- des serres insect-proof pour le double de sécurité du conservatoire des clones certifiés,
- des laboratoires pour la culture *in vitro*, les tests ELISA et les analyses PCR.

L'IFV joue un rôle clé dans l'installation de conservatoires locaux. En effet, en plus de la collection présente sur le Domaine de l'Espiguette, 117 conservatoires régionaux dans l'ensemble des bassins viticoles sont établis afin de maintenir la plus large diversité intra-

variétale possible. Ces collections comptent un total de plus de 18 000 clones concernant 105 variétés. Ces conservatoires représentent un potentiel stratégique pour de futures sélections. En effet, lorsque toutes les plus vieilles parcelles auront été arrachées, ces conservatoires seront l'unique ressource pour de prochaines sélections clonales. Ces conservatoires régionaux ont pour objectif de sauvegarder le patrimoine génétique des cépages en préservant leur diversité mais également de constituer des réservoirs potentiels pour les sélections clonales du futur. Le suivi de ces conservatoires est assuré par les partenaires locaux de l'IFV.

La sélection clonale est un processus long. Depuis les prospections menées dans des vieilles parcelles ou dans des conservatoires régionaux, jusqu'à l'agrément d'un clone et sa multiplication, il faut une durée de 15 ans environ. Entre temps, les processus de sélection sanitaire et de sélection génétique nécessitent de nombreuses années d'analyses et d'observations avant de pouvoir demander l'agrément à la section vigne du CTPS.

Dans la pratique, les étapes de la sélection clonale sont les suivantes :

- choisir au vignoble les meilleures souches existantes dans chaque variété. Les ceps intéressants sont appelés « têtes de clones »
- vérifier l'état sanitaire (sélection sanitaire) et étudier les caractéristiques viticoles (sélection pomologique ou génétique) des clones obtenus (1 souche retenue et multipliée = 1 clone),
- présenter à l'agrément les clones ainsi sélectionnés pour leurs caractéristiques sanitaires et agronomiques. Les instances d'agrément des clones sont le Ministère de l'agriculture et le Comité Technique Permanent pour la Sélection (CTPS).
- Conserver et multiplier les clones agréés pour fournir l'ensemble de la filière viticole sous forme de plants certifiés.

Ces étapes sont illustrées par la figure 21, page suivante.

SÉLECTION CLONALE EN FRANCE

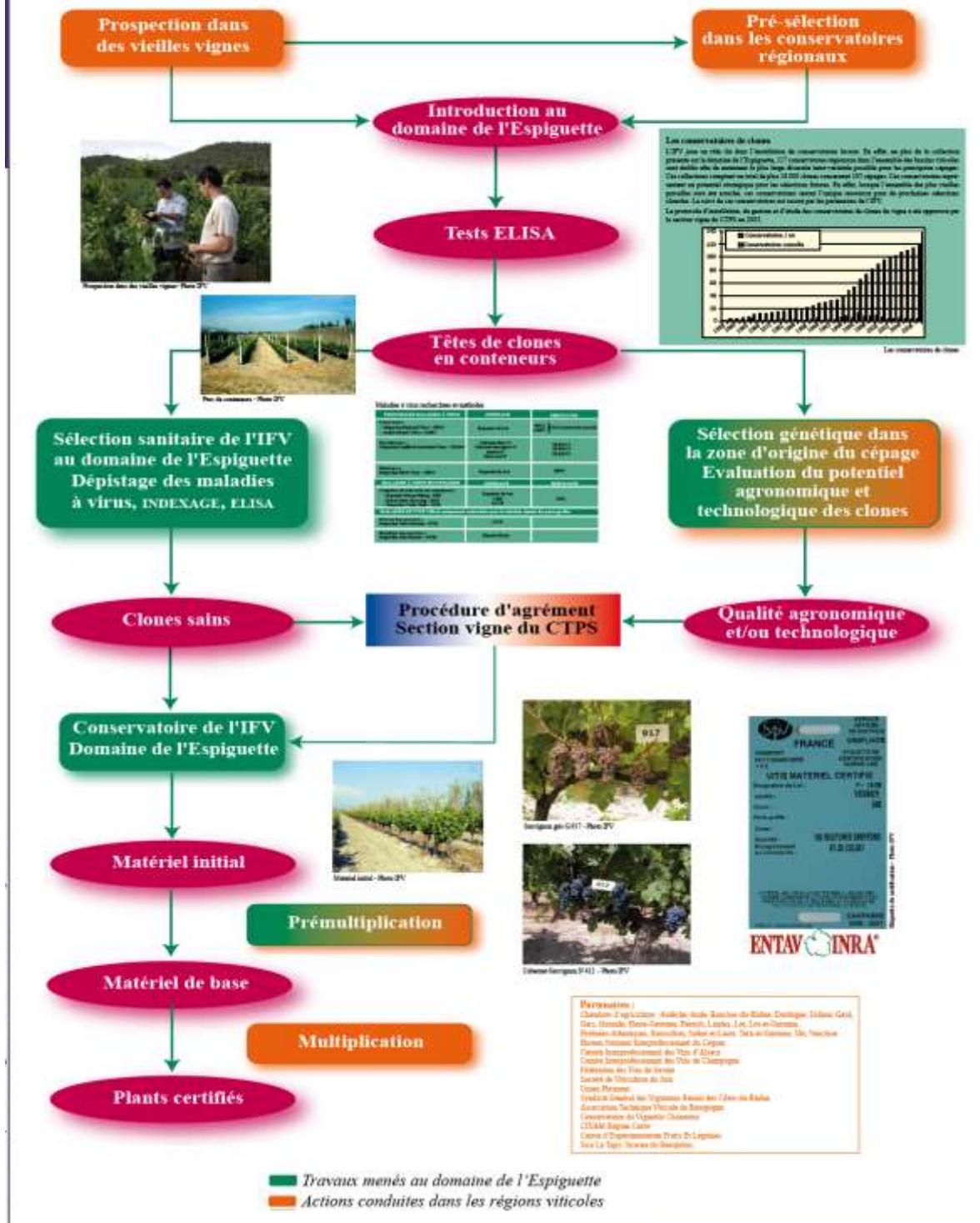


Figure 21 – Organisation de la sélection clonale en France. (Source : IFV France, 2009).

Le site de l'IFV présente le bilan des productions de la sélection clonale depuis qu'elle existe en France, c'est-à-dire depuis 1962. Le centre de sélection a abouti à :

- plus de 18 400 clones introduits et testés : 100 à 200 clones entrent chaque année au Domaine de l'Espiguette pour y être étudiés,
- plus de 4 100 clones conservés au domaine de l'Espiguette, dont :
 - 3 400 clones de cépages de cuves (ces variétés sont inscrites ou non au Catalogue Officiel, des variétés étrangères ou des obtentions de l'INRA),
 - 400 clones de variétés de raisin de table (variétés traditionnelles, obtentions de l'INRA ou variétés étrangères),
 - 300 clones de variétés de porte-greffes.
 - près de 700 variétés conservées qui se répartissent comme suit :
 - 380 sont des variétés de cuve parmi lesquelles 220 sont inscrites au Catalogue Officiel,
 - 240 sont des variétés de raisin de table,
 - 60 sont des variétés porte-greffes.

Après cette présentation de la sélection clonale dans son ensemble, nous allons maintenant détailler les deux volets de celle-ci, c'est-à-dire la sélection pomologique et la sélection sanitaire avec un intérêt particulier pour cette dernière.

b - Sélection sanitaire

La sélection sanitaire est conduite de façon concomitante à la sélection génétique comme le montre le schéma global de la sélection clonale. Le but de la sélection sanitaire est de choisir des ceps non infectés par les virus les plus néfastes pour assurer la multiplication de leur descendance clonale à l'abri des contaminations virales. Aujourd'hui, la certification réglementaire française, en application de la Directive européenne du 9 avril 1968, prend en compte les viroses suivantes : court-noué et enroulement pour les greffons ; court-noué, enroulement et marbrure pour les porte-greffes (WALTER B. *et al.*, 2000 ; IFV France, 2009). Depuis plusieurs années, les instances d'agrément des clones (Ministère de l'Agriculture, Comité Technique Permanent pour la Sélection) prennent aussi en compte les résultats des analyses pour les maladies du complexe du bois strié : écorce liégeuse, cannelures sur *rupestris* et cannelures sur *Kober*. Le tableau suivant liste les viroses recherchées (d'après IFV France, 2009)

Viroses principales	Variétés indicatrices	sérologie
Court-noué : Grapevine Fanleaf Virus (GFLV) Arabis Mosaic Virus (ArMV)	Rupestris du lot	GFLV ArMV
Enroulement : Grapevine leafroll associated virus (GLRaVs)	Cabernet franc Cabernet sauvignon Pinot noir	GLRaV1 GLRaV3 GLRaV2 : pris en compte dans le schéma de certification en France
Marbrure (obligatoire seulement pour les porte-greffes) Grapevine fleck virus (GFkV)	Rupestris du lot	GFkV
Viroses secondaires	Variétés indicatrices	Sérologie
Complexe du bois strié (ou cannelures) : Rupestris stem pitting (RSP) Kober Stem Grooving (KSG) Grapevine Corky Bark (GCB)	Rupestris du Lot 5 BB LN33	GVA GVB
Nécrose de nervures Grapevine vein necrosis (GVN)	110 R	
Mosaïque des nervures Grapevine vein mosaic (GVM)	Riparia Gloire de Montpellier	

Tableau 8 : viroses principales et secondaires recherchées par sélection sanitaire (IFV France, 2009)

La sélection clonale des variétés de porte-greffe est uniquement sanitaire puisque ces variétés sont d'origine assez récente et monoclonale. Pour les cépages de *V. vinifera*, la sélection clonale est sanitaire mais aussi génétique (WALTER B. *et al.*, 2000).

Les méthodes de détection utilisées pour le dépistage des virus dans ces protocoles sont les suivantes :

- tests biologiques : indexage
- tests sérologiques : ELISA
- tests génomiques : RT-PCR

L'indexage biologique est la méthode de référence pour l'agrément des clones. Les autres méthodes (ELISA et PCR) restent complémentaires mais des résultats positifs à ces analyses sont éliminatoires (WALTER B. *et al.*, 2000 ; IFV France, 2009).

Lors de la sélection sanitaire on peut être obligé pour « sauver » un clone de mettre en œuvre des techniques d'assainissement. Il en existe deux qui sont la thermothérapie et la culture d'apex ou de méristèmes. La thermothérapie n'est plus utilisée aujourd'hui, en France,

dans le cadre de la sélection sanitaire. Nous expliciterons cette méthode très brièvement plus loin. Actuellement les assainissements sont donc réalisés par culture d'apex. Cette technique consiste à prélever un apex issu d'une plante virosée et de le micro-greffer en conditions in vitro sur un hypocotyle de plant de semis ou sur un hypocotyle d'embryon somatique. Elle est réalisée uniquement pour les variétés pour lesquelles il n'est pas possible d'obtenir de clone sain par la sélection sanitaire, ou pour des clones présentant un intérêt agronomique particulier mais porteurs de viroses. De nombreux clones de porte-greffes dont certains sont aujourd'hui agréés et largement multipliés ont été préalablement assainis.

Pour bien prendre conscience de ce que représente l'activité de sélection sanitaire, reprenons les chiffres du bilan de l'année 2007 réalisé par IFV France : En 2007, il a été réalisé 510 indexages ligneux plantés en pépinière et 337 indexages par greffes boutures herbacées en serre.

- Pour les propres besoins de sélection de l'IFV, 4 105 échantillons ont été analysés représentant 10 562 tests ELISA pour les virus du court-noué, des enroulements 1, 2 et 3 mais aussi de la marbrure et du GVA.
- En prestations de service pour les organismes publics et les particuliers, 12 138 échantillons ont été analysés représentant 33 036 tests ELISA essentiellement pour les virus du court-noué et des enroulements 1 et 3.
- Pour la sélection et à la demande de clients de l'IFV, 15 clones ont été assainis par microgreffage.
- A la demande de la Protection des Végétaux, 1 587 échantillons ont été testés par PCR pour les phytoplasmes de la flavescence dorée et du bois noir.

Les intérêts de la sélection sanitaire pour la filière viti-vinicole sont les suivants :

La sélection sanitaire permet de contrôler le matériel végétal vis-à-vis des maladies à virus aux différentes étapes de la chaîne de multiplication.

- **Etape 1** : au niveau de l'établissement de sélection IFV, diagnostic de l'état sanitaire du matériel issu des prospections, puis analyses complètes des clones proposés à l'agrément. Ensuite contrôle tous les 5 ans du matériel initial dans le conservatoire et tous les 6 ans du matériel de base dans le conservatoire et chez les établissements de pré-multiplication.
- **Etape 2** : à la demande de Viniflor, contrôles des différentes catégories de matériel.
- **Etape 3** : prestations de service auprès des professionnels, soit dans le cadre des autocontrôles réglementaires, soit pour toute autre demande.

Un clone ne peut être agréé que si les analyses sanitaires sont négatives pour l'ensemble des viroses retenues dans le schéma de certification. Aussi le mauvais état sanitaire de certaines variétés peut conduire à la nécessité de réaliser un assainissement par des techniques de culture *in vitro* afin de sauvegarder ces variétés.

A la demande de la Protection des Végétaux, responsable du contrôle des maladies de quarantaine, des analyses de dépistage des phytoplasmes permettent d'assurer une surveillance du territoire.

Le suivi sanitaire du matériel issu de sélection est permanent et est soumis à une périodicité de contrôles.

Il est important de noter à ce niveau que, dans le cadre de la sélection sanitaire, des mesures réglementaires doivent être mises en œuvre pour l'implantation de parcelles mères devant servir à la confection de matériel de base ou de matériel certifié. En effet, si au domaine de l'Espiguette les sables sont exempts de vecteurs du court-noué de part la texture trop sableuse du sol pour la survie du nématode (dessèchement), les sols pourraient être contaminés dans les régions où se trouvent les partenaires de la sélection vigne et les implantations régionales d'IFV France. Les mesures relatives aux parcelles mères sont regroupés dans l'encadré page suivante (d'après WALTER B. *et al.*, 2000).

Mesures réglementaires relatives aux parcelles mères

(réglementation technique n°1 et annexe n°1 de l'arrêté du 26 septembre 1980)

Production de matériel initial et de matériel de base dans les établissements de sélection et établissements de pré-multiplication

- terrains destinés à la plantation de vignes mères : repos du sol de 12 ans minimum + désinfection
- terrains destinés à la plantation des pépinières
 - désinfection + 12 ans de repos s'ils ont porté une vigne ou une vigne mère
 - désinfection + 6 ans de repos s'ils ont porté une pépinière

Production de matériels de multiplication

- terrains destinés aux vignes mères
 - repos de 12 ans ou 6 ans + désinfection et conditions d'isolement par rapport aux vignes voisines
- terrains destinés aux pépinières
 - désinfection + 6 ans de repos si précédent vigne
 - désinfection + 3 ans si précédent pépinière et distance minimale de 5 mètres de toute vigne ou pépinière

D'une manière générale les terrains ne doivent pas comporter de repousses de vigne. Dans les sables contenant moins de 1% d'argile, il n'est pas exigé de repos ni de désinfection.

Un renforcement de ces mesures est envisagé sur les points suivants :

- ✓ augmenter la durée de repos du sol de 6 à 8 ans (avec désinfection) pour les vignes mères ;
- ✓ pour les pépinières, après une vigne ou une vigne mère, soit 12 ans de repos sans désinfection, soit 8 ans + désinfection ;
- ✓ pour les pépinières, après une pépinière, soit 6 ans de repos sans désinfection, soit 3 ans + désinfection ;
- ✓ dans les sables, instaurer un repos de 3 ans minimum après une vigne ou une vigne mère

Le non-respect des mesures présentées ci-dessus augmente les risques de contaminations par les nématodes qui peuvent être rapides et fréquentes. De telles contaminations dans les parcelles de multiplication sont désastreuses car les plants devront être détruits et la parcelle ne sera plus utilisable. Si les précautions sont prises il est possible de conserver une parcelle à l'abri des contaminations, comme le montre les inventaires sanitaires réalisés sur des périodes de 5 ans sur l'ensemble des parcelles mères françaises.

c - La sélection génétique (pomologique).

La sélection génétique représente l'autre volet de la sélection clonale, cette procédure est obligatoire pour les cépages et complémentaire de la sélection sanitaire. La sélection génétique se réalise en cinq étapes, effectuées à la fois à l'IFV et dans la région d'origine des souches prospectées.

1. Prospections dans des vieilles parcelles de vigne ou dans des conservatoires de clones

Cette toute première étape consiste au marquage et la description ampélographique de souches choisies pour leurs caractéristiques phénotypiques. Ces observations sont réalisées du printemps jusqu'aux vendanges. Durant l'hiver, les sarments des souches marquées sont prélevés et sont ensuite introduits dans le centre de sélection clonale.

2. Culture en conteneurs

Chaque introduction est cultivée dans un conteneur individualisé. Ce matériel végétal est utilisé pour y prélever des bois destinés à la sélection sanitaire et pour confectionner les plants destinés à l'évaluation agro-technologique au vignoble.

3. Collection d'étude

Il s'agit d'une parcelle expérimentale dont l'objectif est le suivi des clones issus de prospections ou de conservatoires en vue de leur éventuel agrément. Installée suivant un protocole très précis, elle n'est composée que de clones ayant satisfait aux tests sanitaires vis à vis du court-noué et de l'enroulement.

Les conditions sont les suivantes :

- terroir traditionnel et homogène pour la variété à étudier, présence d'au moins un clone certifié en guise de témoin et d'un nombre maximum de 20 clones candidats,
- suivi viticole de 5 années pour définir le profil viticole des clones candidats,
- vinifications et dégustations d'au moins 3 millésimes pour évaluer le potentiel technologique et organoleptique des clones candidats à l'agrément.

4. Analyse de l'ensemble des données et décision de demande d'agrément

Nos experts concluent sur le potentiel agronomique et sur le statut sanitaire des clones candidats avant de demander l'agrément à la section vigne du CTPS. Cette dernière rend un avis que le Ministère de l'agriculture entérine dans la plupart des cas, le clone se voit alors attribué par Viniflor un numéro d'agrément officiel.

5. Parcelles de comportement

Il s'agit de parcelles dont l'objet est l'étude de clones agréés, dans un site donné, en vue de comparer leurs caractéristiques culturales et les aptitudes technologiques et organoleptiques de leur produit, en fonction des facteurs du milieu. Le suivi de ces parcelles est concrétisé par des conseils auprès des viticulteurs de la région considérée.

iv - Production et diffusion du matériel sélectionné

Pour être valorisé de façon rapide et efficace, le travail de sélection de l'IFV doit être suivi d'une mise à disposition rapide et en toute sécurité sanitaire du matériel végétal sélectionné auprès de la filière.

L'IFV a pour mission de fournir aux pré-multiplicateurs le matériel initial sous forme de plants greffés soudés ou racinés. En tant que pré multiplicateur, l'IFV est également appelé à fournir du matériel de base aux multiplicateurs. En fonction de l'urgence et des quantités de matériel nécessaires, différentes techniques sont utilisées. Sur le domaine de l'Espiguette, chaque clone est conservé sous forme de dix souches pour les *Vitis vinifera* et de cinq souches pour les porte-greffes. Afin d'être le plus efficace possible, le matériel végétal sain doit être suivi d'une mise à disposition rapide auprès de la filière :

- matériel initial sous forme de plants pour les pré-multiplicateurs,
- matériel de base sous forme de boutures pour les pré-multiplicateurs et de plants pour les multiplicateurs. Différentes techniques permettent de fournir le matériel initial, le matériel de base ou le matériel expérimental :
- boutures ligneuses (greffons et porte-greffes, à partir de matériel cultivé en plein champ ou de multiplication rapide sous serre,
- plants racinés traditionnels et en pots obtenus par bouturage herbacé ou ligneux,

- plants greffés-soudés obtenus par greffage classique (plants traditionnels ou en pots) ou par greffage herbacé.

En règle générale les pré-multiplicateurs sont des chambres d'agriculture partenaire de l'IFV. Il existe cependant trois établissements privés qui sont pré multiplicateurs sur le territoire français, dont un qui se situe à Vix, en Vendée.

2 - La lutte contre les vecteurs

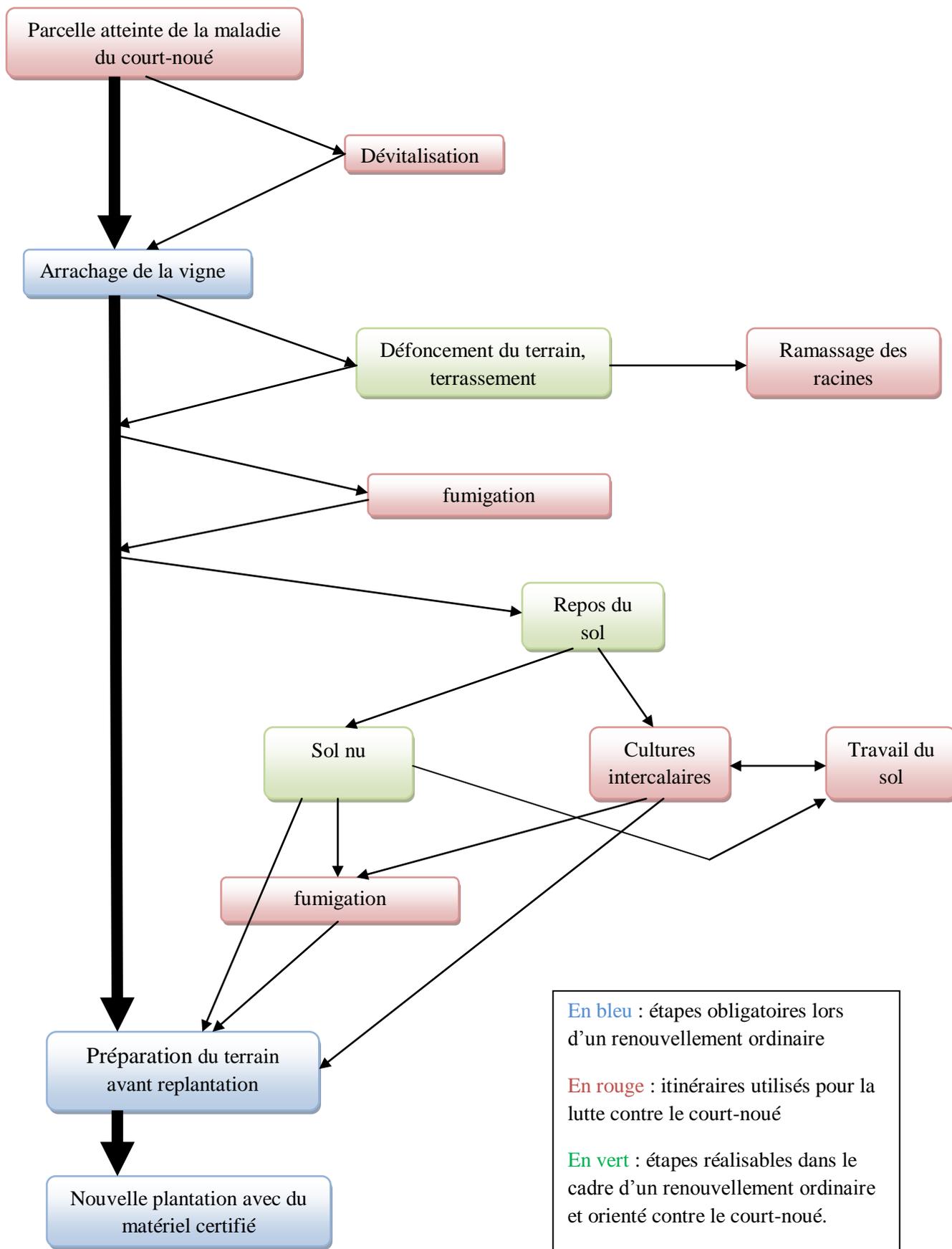
Une fois la culture en place, il n'existe pas de méthode de lutte curative contre le court-noué de la vigne. Aussi, avant toute replantation, il est nécessaire après l'arrachage de laisser le sol au repos afin de priver d'alimentation les nématodes en place pour qu'ils tendent à disparaître de la parcelle. L'arrachage peut être précédé d'une dévitalisation de la vigne qui réduit la survie des racines. Durant la période de repos du sol il est recommandé de pratiquer des cultures annuelles ou bien une jachère travaillée. La culture de plantes nématicides pourra également être envisagée. L'arrachage sera suivi ou non d'une désinfection du sol qui permettra de limiter la recontamination ultérieure de la parcelle. D'autres techniques plus récentes sont proposées pour lutter contre les vecteurs telles que la solarisation des sols et la biofumigation. Il a également été envisagé d'inonder les sols ou d'utiliser des champignons nématicides mais ces pratiques ne sont encore qu'expérimentales.

a - Itinéraires techniques utilisés lors d'un renouvellement parcellaire – recommandations pour la replantation

Lors du renouvellement parcellaire plusieurs stratégies peuvent être associées pour augmenter leur efficacité contre les nématodes :

- Dévitalisation avant arrachage
- Différentes modalités de travail du sol après arrachage
- Désinfection du sol par réalisation de fumigation avec des produits nématicides
- Mise en place de cultures intercalaires annuelles ou jachères travaillées

Les différents itinéraires techniques utilisés en routine dans le cadre d'un renouvellement parcellaire orienté contre la maladie du court-noué sont schématisés ci-dessous (source : FIOLEAU V., 2004).



i - Repos du sol : combien de temps ?

Le repos du sol consiste à interrompre dans la parcelle la culture des espèces végétales hôtes des espèces de nématodes vecteurs. Pour *Xiphinema index*, les hôtes principaux sont en plus de la vigne, le figuier, le jasmin, le peuplier etc... Pour *X. diversicaudatum*, ce sont le fraisier, le framboisier, le rosier, le pêcher, le cerisier, mais aussi de nombreux adventices. Dans ce cas, il est utile de désherber parfaitement la parcelle pour lutter efficacement contre le vecteur d'autant que celui-ci pourrait rester infectieux car ces plantes peuvent également être des réservoirs de l'ArMV.

La replantation peut s'effectuer au minimum un an après l'arrachage, l'idéal étant de laisser le sol au repos pendant 5 à 7 ans voir plus si possible afin que le maximum de nématodes soient détruits naturellement par le manque de nourriture (SRPV – Pays de la Loire, 2005). Cette période de 5 à 7 ans est conseillée par l'ensemble des services régionaux de protection des végétaux ainsi que par l'IFV et ses antennes régionales.

Comme nous l'avons vu dans la partie sur l'épidémiologie du court-noué le temps de persistance des virus dans une parcelle est très variable, fonction des facteurs environnementaux et édaphiques. Il est donc très difficile d'établir un consensus concernant les temps de repos du sol. La loi ne fixant pas de durée minimale, le viticulteur a la possibilité de replanter quand bon lui semble fonction de ces objectifs sur les taux d'éradication du court-noué, mais aussi fonction des contraintes économiques qui, souvent, empêchent les chefs de culture de laisser une parcelle trop longtemps au repos. RASKI *et al.* en 1965 observaient des racines de vigne pouvant persister plus de 4 ans dans le sol après l'arrachage (RASKI *et al.*, 1965). Ils préconisaient donc, suite à ces observations, un repos de 5 ans afin d'éliminer les virus et les vecteurs. Mais les données sont bien plus complexes que cela. En effet, comme nous le savons, il faut également tenir compte de la capacité des vecteurs à survivre, à l'état quiescent, en l'absence totale de nourriture ainsi qu'il faut tenir compte de leur capacité de rétention des virus. DALMASSO et VUITTENEZ estiment qu'une élimination quasi-totale du court-noué dans une parcelle arrachée aurait lieu au bout d'une dizaine d'années seulement (DALMASSO et VUITTENEZ, 1978). En 1969, VUITTENEZ *et al.* ont mené une étude très intéressante, déterminant les pourcentages de recontamination d'une parcelle infectée par la maladie du court-noué en fonction des temps de repos du sol, sans dévitalisation avant arrachage, ni fumigation avec des produits nématicides. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous (VUITTENEZ *et al.*, 1969).

Durée de repos entre l'arrachage et la replantation	Pourcentage de recontamination
6 mois	92 à 97 %
1 an	33 à 49 %
2ans	21 à 38 %
5ans 1/2	5 à 6 %

Tableau 9 : pourcentage de recontamination d'une parcelle infectée en fonction du de repos laissé au sol (VUITTENEZ *et al.*, 1969)

Ce tableau illustre très bien l'intérêt d'un repos du sol d'au moins 5 ans. Une replantation immédiate au printemps suivant (6 mois de repos) ne présente aucun intérêt dans la lutte contre le court-noué puisque la recontamination est quasi-totale.

L'étude menée par V.FIOLLEAU sur la présence du court-noué dans 8 des plus grands châteaux du bordelais (club des 8) confirme que les chefs de culture essaient de tenir compte de ces périodes. En effet, pour ces châteaux, la durée entre dernière récolte et replantation s'homogénéise entre 4 et 5 ans (FIOLLEAU V., 2004).

ii - Dévitalisation et arrachage

Il est très fortement recommandé de dévitaliser la vigne avant l'arrachage. Sous l'impulsion des SRPV et de l'IFV, cette dévitalisation est maintenant pratiquée par tous les viticulteurs, à l'exception des viticulteurs pratiquant l'agriculture biologique qui n'ont pas d'autorisation pour l'emploi des herbicides systémiques chimiques quelle que soit leur présentation.

La dévitalisation s'effectue par la pulvérisation en plein d'un herbicide systémique à base de glyphosate sur le feuillage à la dose de 2880 g/Ha de glyphosate pour 200L/Ha de bouillie. Cette opération doit être réalisée en l'absence de vent, juste après la récolte sur un feuillage encore fonctionnel à l'aide de panneaux récupérateurs de bouillie. La dévitalisation pourra ainsi s'effectuer tout au long de l'hiver jusqu'aux racines les plus profondes et l'arrachage pourra s'effectuer dans les meilleures conditions au printemps suivant.

Il faut noter à ce niveau que la dévitalisation peut aussi être effectuée avec des produits à base de sulfosate (WALTER B. *et al.*, 2000) ou de ticlopir.

Un arrachage soigné en évitant de laisser tout morceau de racines et de bois morts permettra d'éviter la recontamination de la parcelle par le court-noué mais aussi par le pourridié (champignon transmis au niveau du sol : *Armillaria mellea*) qui peut aussi entraîner une grande mortalité de ceps. L'arrachage le plus performant est un arrachage pied par pied

qui va permettre d'extirper le maximum de racines de vigne (ESMENJAUD D., 2000). Le sol est ensuite défoncé à l'aide de charrues ou d'une sous-soleuse pour éliminer les repousses sur lesquelles les nématodes survivent. L'idéal est d'effectuer un ramassage manuel des racines non extirpées lors de l'arrachage par des personnes suivant la machine. Ces travaux du sol doivent être soignés car une bonne déstructuration permet d'éliminer un grand nombre de nématodes, surtout dans les couches les moins profondes. Le travail du sol présente un deuxième intérêt dans la lutte contre le court-noué en permettant une bonne implantation des cultures intercalaires à visée nématicide qui peuvent être mise en place dans un programme de lutte (cf le chapitre plantes nématicides, plus loin).

iii - Désinfection chimique des sols

Pour tuer les nématodes il est nécessaire d'utiliser des fortes doses de nématicides. L'utilisation des nématicides est très délicate et requiert l'usage de techniques d'applications et d'outils particuliers pour réussir à atteindre les nématodes dans le sol. Les nématicides sont très efficaces mais ils ne permettent pas l'éradication totale des nématodes. Ils retardent plus ou moins la réapparition des symptômes viraux consécutivement à une réduction des effectifs des vecteurs dans le sol (ESMENJAUD D., 2000). Il existe un panel assez large de nématicides chimiques appartenant à quatre grandes familles :

- Les produits organo-halogénés à base de brome ou de chlore. Ce sont les plus anciennement utilisés (dès la fin de la seconde guerre mondiale). Ils sont utilisés en traitement de sol comme fumigants. Le bromure de méthyle est également utilisé pour la désinfection des graines.
- La famille des thiocyanates et dérivés soufrés. Ils diffusent sous forme de vapeur et sont désignés comme fumigants ou précurseurs de fumigants.
- Les organophosphorés connus pour leur activité sur les insectes. Ils sont efficaces sur les nématodes par augmentation des doses.
- Les plus récents sont les carbamates qui agissent de façon similaire aux organophosphorés et aux mêmes indications de doses.
- Enfin, le sulfure de carbone, inclassable, est toujours utilisé. Il est actuellement présent sous forme de tétrathiocarbonate de sodium qui agit comme fumigant dans le sol par dégagement de ce composé.

Il existe d'autres familles de nématicides, telles que les avermectines qui ne sont pas utilisées en pratique. Pour être tout à fait exhaustif, il faut citer à ce niveau des matières actives découvertes depuis peu et dont certaines paraissent très efficaces : des toxines et exsudats de plantes et de champignons. Nous reparlerons brièvement de ces nouveaux nématicides au cours de ce chapitre.

Il faut savoir que de nombreux produits ne sont pas ou plus autorisés en France, les autorisations d'utilisation variant en fonction du type de culture. A l'heure actuelle il n'y a plus qu'une seule molécule qui est autorisée dans le cadre de la désinfection des sols viticoles contre les nématodes vecteurs du court-noué : le 1-3 dichloropropène. Cette molécule appartient aux organo-halogénés. Elle agit par contact. Comme tous les produits de cette famille (seul le bromure de méthyle est autorisé en France dans d'autres domaines que la viticulture) il est très soluble dans l'eau et passe dans la phase liquide du sol. Les fumigants repassent successivement de l'état gazeux à l'état liquide en fonction de leur pression de vapeur. Celle du 1-3 dichloropropène est proche de celle de l'eau avec un point d'ébullition à 104°C. Le produit est injecté dans le sol, le plus profondément possible sur la hauteur de la terre arable (en général à une moyenne de 30 cm). Plus le sol est léger, plus la diffusion du produit sera bonne. Il est donc indispensable que le sol est été travaillé finement avant traitement. L'efficacité du produit étant limitée par sa diffusion, l'application de 1-3 dichloropropène est déconseillée par l'IFV dans les sols lourds (taux d'argile supérieur à 30%), compacts (très peu d'interstices) et profonds (les fiches pratiques de l'ITV). Ceci rejoint les résultats de l'étude menée en Champagne sur les parcelles Mesnil et Cumières qui avait conclu à l'inefficacité de la désinfection chimique dans ces sols trop profonds où la diffusion est insuffisante (majorité des nématodes retrouvés aux alentours de 1 mètre de profondeur). La température du sol est également un facteur très important à prendre en considération. A basse température, le produit diffuse mal. A température trop élevée, le produit a tendance à remonter à l'état gazeux et à se perdre.

En pratique, la désinfection du sol devra être raisonnée et limitée aux parcelles :

- Dont la contamination a été constatée visuellement et/ou confirmée par des analyses et dont le taux de contamination est élevé
- Qui ont subi une dévitalisation et dont le sol a été mis au repos

Elle est à réaliser en début ou en fin d'été, sur sol ressuyé non compacté et dont la température est comprise entre 10 et 20°C. L'application pour être efficace doit s'effectuer en profondeur (sur la hauteur de la couche arable si possible). Il faut réaliser un traitement en plein (c'est-à-dire une injection continue du produit) par des coutres séparés de 30 à 40 cm.

Un roulage doit être réalisé juste après l'application pour éviter une trop grosse fuite de matière active, surtout si la température est élevée. Dans certains cas, il est également possible de filmer le sol pour éviter l'évaporation (photo 82). Deux à trois mois après, il faut effectuer une aération minutieuse du sol à la charrue pour permettre l'évacuation du gaz.



Photo 82 : application du nématicide à l'aide d'injecteurs situés à l'extrémité de coutres, suivie d'un bâchage du sol.
(Source : vectors of plant viruses, 2008).

Les bombones de produits sont situées sur la plate forme de l'appareil (on peut en apercevoir une tout à fait en haut à gauche). De tels traitements nécessitent des engins puissants et ont un coût élevé.

Il faut noter que ce produit est très phytotoxique et que l'application ne peut avoir lieu que sur des sols nus. Dans le cas où l'intervention intervient avant la mise en place de cultures intercalaires ou avant la replantation, il faut tenir compte de la rémanence du produit. Le 1-3dichloropropène est autorisé sur vigne à la dose de 600 l/Ha à une concentration de 1100g/l. Compte tenu de sa toxicité rendue très importante par sa solubilité dans les eaux du sol, ce produit est susceptible d'être interdit dans le cadre de la protection intégrée du vignoble en France.

Il faut citer à ce niveau l'aldicarbe, un organophosphoré, qui a été utilisé en France jusqu'à la fin de l'année 2007, date de son interdiction sur le territoire. L'aldicarbe agit à la

fois par contact et de façon systémique. L'action de contact entraîne une paralysie souvent irréversible des nématodes puis une impossibilité des nématodes survivant de repérer les plantes hôtes Cette deuxième toxicité résulte de la destruction de récepteurs sensoriels (les amphides). L'absorption, au moins en partie, du produit par le système racinaire de la plante induit une action systémique permettant de toucher les nématodes qui auraient échappés au produit (MUGNIERY D., 2006). L'aldicarbe se présente sous forme granulée ce qui rend son utilisation très facile. De plus, il est non phytotoxique et peut donc être appliqué n'importe quand, jusqu'à la date de plantation. En pratique, lorsqu'il était encore autorisé, l'aldicarbe s'appliquait à une dose de 200 kg/ha, avant la plantation, quand la fumigation après arrachage n'avait pas été réalisée (ESMENJAUD D., 2000). L'application devait respecter les conditions d'emploi définies dans l'arrêté du 15/12/1988 et le produit ne pouvait être appliqué qu'après agrément de la parcelle par la société distributrice (WALTER B. *et al.*, 2000). Cet agrément consistait en une étude préalable de l'environnement hydrographique des parcelles devant être traitées (BOUQUET A. *et al.*, 2004).

Deux études ont été menées pour mesurer l'activité des traitements nématicides en combinaison avec une dévitalisation avant arrachage. Les résultats sont présentés dans les tableaux ci-dessous (tableaux 10 et 11).

traitements		Nombre de ceps contrôlés	% de ceps atteints (tests ELISA)	
			6 ^{ème} feuille	7 ^{ème} feuille
1-3dichloropropène	Eté 1987	280	2,9	6,4
aldicarbe	Septembre 87	160	1,9	2,5
aldicarbe	Avril 88	120	2,5	20,0
1-3dichloropropène puis aldicarbe	Juin 87 Septembre 87	160	2,5	6,9
Dévitalisation/glyphosates puis 1-3 dichloropropène	Octobre 86 Juin 87	120	0	0
Dévitalisation/glyphosates puis aldicarbe	Octobre 86 Avril 88	40	0	0

Tableau 10 : effets des nématicides seuls et associés à une dévitalisation des souches (DESCOTE A., MONCOMBLE D., 1995)

Arrachages : Mai 1987

Replantations : Mai 1988

Modalités	Nombre de ceps contrôlés	% de ceps recontaminés (vérification par test ELISA)							
		1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994
Témoin	40	1	27,5	42,5	52,5	67,5	72,5	-	72,5
dévitalisation	40	0	0	2,5	2,5	5	5	-	12,5
Dévitalisation + désinfection (fumigant)	50	0	0	0	0	0	0	-	0

Tableau 11 : effets des nématicides seuls et associés à une dévitalisation des souches (Source : Station Fédérale de Recherches Agronomiques de Chagnins, Rapport d'activité 1994)

En conclusion, la désinfection chimique des sols présente une efficacité limitée voir désuète dans les sols lourds et profonds. Elle ne doit maintenant être réalisée qu'en association avec une dévitalisation préalable de la vigne pour donner des résultats justifiant la toxicité de l'opération, comme le montrent les résultats ci-dessus. Cependant, dans ce cas, elle peut permettre de retarder l'apparition des symptômes de façon intéressante. En effet, l'impact de la virose est d'autant plus limité que la contamination est plus tardive. C'est dans ce but que la désinfection des sols est encore réalisée, mais en raison de la très grande toxicité de ces produits pour l'environnement et pour les utilisateurs, il faut se diriger vers d'autres méthodes de lutte et prévoir l'interdiction totale des nématicides chimiques en viticulture. C'est dans cet optique que la culture de plantes nématicides ou encore la biofumigation apparaissent comme des méthodes de lutte intéressantes pour l'avenir.

b - Gestion de la jachère : sol nu ou cultures intercalaires.

Pendant la période de repos du sol il est recommandé de pratiquer des cultures annuelles ou bien une jachère travaillée sur sol nu.

i - Sol nu

Si le viticulteur choisi de laisser le sol nu (on parle également de jachère noire), il devra entretenir le sol par des labours et des sarclages fréquents, qui permettent de diminuer les populations de nématodes dans les couches superficielles. Cet entretien a également pour but de détruire les repousses de vigne éventuelles, mais aussi les autres plantes hôtes des

vecteurs du court-noué, surtout pour *X. diversicaudatum* dont beaucoup de plantes hôtes sont aussi hôtes de l'ArMV. Il faut également veiller à la contamination par des haies de bordure composées d'espèces spontanées potentiellement hôtes pour le couple ArMV/*X. diversicaudatum* (ESMENJAUD D., 2000).

ii - Mise en place de cultures intercalaires

Lorsque le choix est fait d'établir des cultures intercalaires, deux possibilités s'offrent au chef de culture :

- Il peut cultiver des plantes annuelles n'ayant aucune incidence directe sur le nématode. Cette culture « neutre » permet d'entretenir le terrain, d'éviter son érosion et l'entraînement de nématodes par les eaux de ruissellement sur des parcelles en contrebas. Ce type de culture permet aussi le travail du sol qui est nécessaire pour la replantation d'une année sur l'autre. Il est conseillé d'alterner les cultures pour ne pas épuiser le terrain. Les plantes non-hôte des viroses à utiliser doivent avoir un enracinement profond pour permettre une bonne déstructuration du sol et l'assécher le plus profondément possible. D'après l'étude réalisée par V. Fiolleau, avec les avis de D.ESMENJAUD et G. DEMANGEAT il a été décidé de s'orienter vers des plantes comme le tournesol, le chanvre ou encore le sorgho pour la modalité de renouvellement parcellaire n'utilisant pas les plantes nématicides (FIOLLEAU V., 2004).
- Des plantes ayant une activité nématicide peuvent être choisies. Les propriétés nématicides de ces plantes s'exercent selon deux modalités, soit par exsudats racinaires, soit par incorporation et dégradation de la plante après culture. L'utilisation des cultures nématicides ne fait pour l'instant l'objet que de recherches expérimentales, mais des résultats intéressants ont été obtenus. Cette stratégie de lutte va très probablement prendre de l'ampleur et fait l'objet d'espoirs à l'heure actuelle pour trouver des alternatives aux nématicides chimiques. Nous allons donc consacrer un paragraphe aux quelques expériences publiées et à la description de quelques plantes possédant une activité intéressante.

c - Les alternatives possibles aux techniques « classiques » de renouvellement parcellaire.

La recherche dans ce domaine est très active car les enjeux économiques sont importants. En effet, nous avons vu que les traitements nématicides, s'ils ne permettent pas d'éradiquer les nématodes totalement, retardent l'apparition des symptômes ce qui permet aux chefs de culture d'envisager une replantation assez rapidement. L'interdiction définitive des fumigants étant discutée au niveau Européen depuis plus d'une dizaine d'année déjà (MUGNIERY D., 2006) il est important d'envisager des méthodes alternatives pour que les sols viticoles envahis par le court-noué ne restent pas en jachère sur de trop longues périodes synonymes de pertes économiques importantes voir insurmontables pour certaines exploitations. Parmi ces alternatives nous présenterons brièvement l'utilisation des plantes nématicides qui paraît actuellement être la voie privilégiée. La biofumigation et l'utilisation de champignons nématicides sont d'autres voies de recherche à considérer. D'autres méthodes ont déjà été testées et nous en citerons quelques unes.

i - Les plantes nématicides : une alternative possible à la désinfection chimique des sols.

Aujourd'hui, beaucoup de plantes sont connues comme ayant des propriétés nématicides mais peu d'entre elles sont spécifiques à *X. index* et encore moins pour *X. diversicaudatum*. Les plantes nématicides s'utilisent en tant que :

- Engrais vert à enfouir (ABALLAY E. *et al.*, 2004)
- Mulch
- Culture intercalaire ou rotation de culture

Les mécanismes d'action et les différentes molécules produites par les plantes nématicides sont très nombreux. Les substances actives peuvent être exsudées des racines et agir soit en inhibant la pénétration des larves dans les racines, soit en inhibant l'éclosion des œufs, soit en empoisonnant les nématodes. Elles peuvent aussi être synthétisées en réaction à l'infestation et inhiber le développement des larves ou être déjà présentes dans les tissus au niveau des tiges, feuilles, fleurs, graines ou racines et agir en empoisonnant la larve ou en bloquant son développement et sa multiplication. Les mécanismes induits par la pénétration de la larve dans la plante ne seront pas intéressants dans notre cas car les *Xiphinema* restent dans le sol et ne sont pas des parasites à proprement parler de la vigne.

Les plantes peuvent être introduites pendant la période de jachère en précédent cultural ou en association avec la vigne en place. Lorsque les plantes sont incorporées au sol, c'est la décomposition qui permet d'obtenir l'effet nématocide. Elles sont enfouies après broyage. On peut noter que l'enfouissement nécessite un travail du sol qui sera également néfaste aux nématodes de la couche supérieure. D'autres méthodes peuvent consister à incorporer au sol des broyats, extraits de plantes ou tuteurs pouvant servir d'amendements organiques nématocides. Dans ce dernier cas, il n'y a pas de culture en place. L'analyse des substances produites lors de la décomposition de ces matières organiques dans le sol a permis d'identifier, en dernière phase de décomposition, outre les éléments N, P, K, qui stimulent l'activité des parasites ou prédateurs naturels des Nématodes, différents acides gras volatils (AGV) à propriétés nématocides. L'effet nématocide de ces AGV s'ajouterait à celui des molécules contenues dans les tissus des plantes et libérées dans le sol après broyage, macération ou extraction (CAYROL J.C. *et al.*, 2008).

Une étude a évalué l'effet nématocide de 8 plantes afin de contrôler les populations (impact pendant la culture et après incorporation des résidus de culture) de *X. index* et *X. americanum* dans des vignobles chiliens. Les espèces végétales concernant cette expérimentation étaient *Brassica napus*, *Calendula officinalis*, *Cosmos bipinnatus*, *Gaillardia picta*, *Lupinus albus*, *Tagetes patula*, *Thymus vulgaris*, *Zinnia elegans*. Seul le navet (*Brassica napus*) a significativement réduit les populations de *X. index*, et le Cosmos (*Cosmos bipinnatus*) les populations de *X. americanum* (AUROY O., 2006).

Une autre publication signale que la Rue fétide (*Ruta graveolens*) semble également réduire les populations après son incorporation (DJIAN-CAPORALINO *et al.*, 2002).

Une étude réalisée plus récemment dans le cadre d'un master en « Biologie et Technologie du Végétal » a donné des résultats intéressants. Dans ce travail, 4 plantes ont été testées dans le cadre d'une gestion des jachères par des cultures intercalaires à effet nématocide :

- La luzerne (*Medicago hybride*) – famille : *FABACEAE*
- Le Tagète (*Tagetes minuta*) – famille : *ASTERACEAE*
- La vesce velue (*Vicia villosa*) – famille : *FABACEAE*
- Le Lupin blanc (*Lupinus albus*) – famille : *FABACEAE*

Leur capacité d'enracinement dans les sols pauvres du Bordelais, en tube comme sur le terrain, est satisfaisante pour la Luzerne et le Tagète avec une profondeur moyenne d'enracinement d'environ 80 cm. Elle est un peu faible pour la Vesce et le Lupin (environ 40 cm). Les plantes ont toutes montrées une activité nématocide réduisant environ d'un facteur 2 les populations de nématodes par rapport au témoin. Les réductions les plus importantes ont été notées pour le Tagète et la Vesce et les tests statistiques ont permis d'affirmer que ces plantes ont un effet de réduction sur les foyers de nématodes en champs (MORIN E., 2007). Cependant, l'interprétation des résultats de cette étude est très difficile et une autre étude lui faisant suite est en cours de réalisation pour essayer d'améliorer les méthodes utilisées. Dans ce nouveau travail trois autres plantes encore jamais testées le seront. Même si l'interprétation des résultats obtenus sur le terrain dépend encore de trop de facteurs mal gérés dans les modes opératoires, les essais préalables, réalisés en condition de laboratoire montrent que les plantes nématocides sont intéressantes.

Enfin, une autre publication émanant du GRAB (Groupe de Recherche en Agriculture Biologique) en 2006 compare l'efficacité de différents extraits d'Alliacées de synthèse avec l'aldicarbe. Les propriétés biocides des Alliacées sont attribuées aux composés soufrés volatils produits par la dégradation des tissus. Ces molécules sont essentiellement des disulfures : le disulfure de diallyle (DADS), le disulfure de diméthyle (DMDS) et le disulfure de dipropyle (DPDS). L'utilisation possible de ces alliacées en tant que biofumigants a suscité plusieurs études dont les résultats sont encourageants. Les résultats de la première partie de l'étude réalisée dans des tubes de terre contenant des nématodes, ont montré que ces molécules sont aussi efficaces que l'aldicarbe. Il est important de noter que le DMDS est un produit très dangereux pour l'homme et l'environnement et ne présente donc pas d'intérêt par rapport à l'aldicarbe au niveau des risques toxicologiques et éco-toxicologiques s'il est utilisé tel quel. Ce premier essai est suivi d'un essai plante nématocide réalisé avec : l'ail (*Allium sativa*), le ricin (*Ricinus communis*), le tagète minuta (*Tagetes minuta*), le tagète patula (*Tagetes patula*), la rue fétide (*Ruta graveolens*), la moutarde blanche (*Sinapis alba*), le sorgho comme témoin neutre et l'aldicarbe comme référence. Malheureusement, les populations de nématodes n'ont pas survécues pendant les six mois de l'essai et aucun résultat n'a pu ressortir. L'expérience sera reconduite en améliorant les conditions pour diminuer la létalité trop importante des nématodes due uniquement aux transferts de ces derniers et à des changements de condition mal adaptés (CHOVELON M., 2006).

L'objectif de cette expérience sera de déterminer la dose optimale d'efficacité d'un ou de plusieurs composés soufrés à partir des extraits de synthèse, la dose initiale étant connue.

Cela permettra ensuite de reporter cette dose optimale à une quantité de matière fraîche ou sèche de végétal. A terme, la finalité est de pouvoir mettre en place une culture d'Alliacées ou alors d'enfouir dans le sol les déchets organiques de ces Alliacées pour limiter les populations de *Xiphinema index*.

Nous comprenons donc que nous n'en sommes qu'aux balbutiements de l'utilisation des plantes nématicides dans la gestion du court-noué de la vigne. Il faut noter que des obstacles supplémentaires existent dans le domaine de la viticulture par rapport à d'autres cultures. En effet, les terrains viticoles sont souvent pauvres et très secs, la vigne souffrant des excès d'eau et pour la qualité du vin. Ceci interdit la culture de beaucoup d'espèces qui ne survivraient pas dans ces conditions et peut également diminuer les capacités et la profondeur d'enracinement pour les plantes capables de s'implanter dans de tels sols. De plus, il faut tenir compte de la sensibilité des cultures potentiellement nématicides à un stress au cuivre, les terres viticoles étant souvent saturées en cet élément minéral qui devient rapidement phytotoxique pour la plupart des espèces végétales (AUROY O., 2006).

ii - La biofumigation

La biofumigation utilise les mêmes principes d'application que la désinfection chimique des sols. L'intérêt de cette méthode est qu'elle utilise des produits moins toxiques pour l'utilisateur et/ou pour l'environnement. Il est possible d'utiliser des fumigants provenant de la dégradation de plantes à effet nématicide mais aussi de la dégradation de matière organique d'origine animale. Une étude récente menée en Espagne dans la région de la Murcie au sud-est du pays a étudié l'efficacité de la biofumigation. Le fumigant utilisé est un mélange de décompositions de mouton et de poulet dans des proportions de 7 :3 respectivement. Les résultats ont montré qu'à la dose de 10kg.m⁻² cette biofumigation associée à une jachère d'un an était efficace pour contrôler les populations de *X.index* entre 0 et 60 cm de profondeur, malgré la présence de racines encore vivantes dans le sol. De tels résultats laissent penser que la biofumigation présente une efficacité aussi intéressante que la désinfection chimique avec une toxicité moindre. Les mêmes problèmes sont posés concernant la profondeur d'action des produits et leur intérêt dans les sols lourds. Dans cette étude, une profondeur d'action de 60 cm semble satisfaire l'équipe de recherche puisque cette couche supérieure représente la zone où s'établissent normalement les racines dans les

premières années après la replantation. Les auteurs mettent également en avant un deuxième atout pour les biofumigations qui est d'augmenter la biodiversité des sols (BELLO A., 2004). Du côté des inconvénients on peut noter que les doses employées sont fortes (10kg.m^{-2}) entraînant une fertilisation du sol en matière organique très importante qui peut être défavorable à la vigne notamment en provoquant une pousse exagérée des jeunes plants qui les rendra plus susceptibles aux maladies cryptogamiques telles que le mildiou par exemple (avis personnel). De plus, une fumure organique aussi importante n'est pas dénuée d'impact sur l'environnement (quantité de nitrates correspondant notamment).

iii - Utilisation de champignons et bactéries nématocides

L'utilisation de champignons nématocides est une autre voie à envisager. A l'heure actuelle il ne semble pas que ce soit la piste privilégiée par le monde viticole mais c'est un volet de la lutte nématocide qu'il ne faut cependant pas oublier et qui est la source de beaucoup d'espérance pour d'autres cultures. Un article très complet publié par le laboratoire de biologie des invertébrés de L'INRA d'Antibes traite ce sujet. Nous allons en extraire les grandes lignes pour comprendre comment agissent ces champignons (CAYROL J.C. *et al.*, 2007). Il existe plusieurs mécanismes qui induisent l'effet nématocide des Champignons :

- Les champignons prédateurs : ils ont la capacité de prendre au piège les nématodes et de s'en nourrir. Ils sont présents naturellement dans le sol, mais en quantité insuffisante. Il faut donc en introduire. Il existe une spécialité commercialisée à base d'*Arthrobotrys irregularis*, un Hyphomycète. Des recherches sont en cours pour trouver d'autres champignons capables de se développer dans d'autres types de sol et de lutter contre d'autres nématodes que les méloïdogines.
- Les champignons ovicides : ces Champignons ont la propriété de tuer les oeufs des Nématodes. A l'intérieur de ces derniers, on peut trouver de nombreuses espèces de Champignons; beaucoup d'entre eux vivent en saprophytes, envahissant secondairement des oeufs déjà morts. Seuls de véritables parasites sont à retenir en vue d'être utilisés comme agent de lutte biologique. Parmi eux, *Paecilomyces lilacinus* et *Verticillium chlamydosporium* ont fait l'objet d'études approfondies. Le principal problème des champignons ovicides est qu'ils détruisent les nématodes nuisibles comme les nématodes utiles (notamment les espèces libres associées aux bactéries de la nitrification). De plus, il existe pour *Verticillium chlamydosporium* un risque grave de parasitisme chez les animaux à sang chaud dont l'homme. Il n'y a pas de produit

commercialisé actuellement et les commissions de contrôle médical participant à l'homologation du produit l'interdiront. Il faut donc rester prudent quand aux possibilités d'utiliser un jour les champignons ovicides.

- Les champignons nématophages à spores adhésives. Ils appartiennent à plusieurs classes : Oomycètes, Zygomycètes, Deutéromycètes, Basidiomycètes et Hyphomycètes. Ils sont très ubiquistes et polyphages ce qui les rend, à priori, intéressants comme agents de lutte contre les nématodes. Le problème est que ce sont des parasites obligatoires et toutes les tentatives de culture sur des milieux synthétiques ont échouées. De ce fait aucune application industrielle n'a encore été mise au point.
- Les endomycorhizes à vésicule et à arbuscule. Les mycorhizes sont des champignons associés aux racines des végétaux et qui peuvent pour certaines protéger la plante des nématodes. Il se développe un réseau mycélien externe et interne aux racines. Le réseau mycélien intrinsèque qui se développe dans le cortex des racines est composé de vésicules (structures de réserve) et d'arbuscules (structures d'échanges entre la plante et le champignon). Plusieurs mécanismes d'action sont supposés, découlant de l'interaction entre les mycorhizes et le nématode : compétition trophique intraracinaire, plante rendue plus résistante grâce à l'amélioration nutritionnelle que lui confère la symbiose mycorhizienne, masquage du pouvoir attractif exercé par les racines vis-à-vis des Nématodes. Ces champignons sont en cours d'étude et il faut attendre pour savoir si l'on pourra aboutir à des produits commercialisables. D'autre part, ce sont des parasites obligatoires et les mêmes problèmes de culture qu'avec les champignons nématophages à spores adhésives se posent.

Les bactéries nématocides font partie des méthodes de lutte promouvant les antagonismes naturels. A ce jour, une seule bactérie, *Pasteuria penetrans*, fait l'objet d'études approfondies. Les endospores de la bactérie peuvent se fixer sur le nématode lors de ses déplacements dans le sol. Un grand nombre d'endospore fixé peut provoquer la mort du nématode mais en général il n'est pas affecté par cette fixation. Les endospores tuent le nématode lorsque celui-ci pénètre dans les racines. Elles germent, pénètrent la cuticule et détruisent totalement les structures internes du nématode qui devient un « sac à spore ». Ce parasitisme est certainement intéressant, mais pas dans le cas des *Xiphinema* vecteurs de virus qui ne pénètrent pas dans les racines de la vigne.

Enfin, les toxines de micro-organisme sont également étudiées pour lutter contre les nématodes. Ces toxines peuvent provenir aussi bien de champignons que de bactéries. Elles agissent par contact et peuvent être nématifuges, nématostatiques ou nématicides *sensu-stricto*. Nous n'entrerons pas dans les détails car de très nombreuses toxines bactériennes peuvent être étudiées. La recherche de toxines nématicides chez les champignons a seulement consisté jusqu'à présent à tester l'effet nématicide *in vitro* de quelques filtrats de cultures.

iv- Autres alternatives

Beaucoup d'autres alternatives ont été testées. Nous allons énumérer les principales. La désinfection des sols par la chaleur permet de tuer les nématodes. Le problème est de pouvoir appliquer cette méthode en milieu naturel. Il faut une source d'énergie naturelle pour que cela soit réalisable. L'énergie utilisée est donc l'énergie solaire qui est captée en recouvrant le sol d'un film plastique. La bâche permet la transmission du rayonnement solaire au sol et une élévation de la température (supérieure à 40°C jusqu'à 25 cm de profondeur). Le sol doit être préparé et humidifié avant la pose du plastique afin que l'eau serve de conductrice de chaleur. Une durée d'ensoleillement de 250 heures est nécessaire (MORIN E., 2007). La solarisation des sols n'est réalisable que dans les régions où l'ensoleillement est suffisant. Cette technique est surtout utilisée pour la lutte contre les champignons telluriques et les adventices. Son effet reste limité contre les nématodes à cause de sa faible profondeur d'action (BELLO A. *et al.*, 2004). De plus, les résultats publiés montrent que la texture du sol doit être légère (sol sableux) pour qu'il y ait une efficacité et ce n'est, en général, pas le cas des terrains viticoles. Lors de l'expérience citée juste avant, réalisée en Espagne dans la région de la Jumilla, la solarisation a été testée en plus de la biofumigation. Il a été conclu que la solarisation couplée à une jachère de 1 an n'était pas effective sur les populations de nématodes (BELLO A. *et al.*, 2004).

Certains engrais à base d'azote ammoniacal, engrais chimiques, fumiers, compostes ou l'ammoniaque appliqué directement paraissent également intéressants comme agents de contrôle des nématodes (Vector of plant viruses, 2008). De nombreux rapports ont déjà montré ces bénéfices. L'irrigation avec des engrais relarguant de l'ammoniaque peut diminuer les populations si les applications sont suffisamment régulières. L'introduction de 50kg/Ha d'azote dans des sels d'urée peut réduire de moitié les populations de la plupart des ectoparasites à raison de 3 à 5 applications à 30 à 45 jours d'intervalle. Cette méthode doit

encore être testée en conditions naturelles pour tirer des conclusions intéressantes. D'autre part, les vignes ont un besoin limité en azote et certains vignobles sont déjà en excès. Cette technique doit donc être testée et appliquée avec précaution et ne paraît pas compatible avec la production de vins de qualité.

Dans les vignobles irrigués, l'arrêt de l'apport en eau provoque un dessèchement important du sol et a été utilisé pour essayer de contrôler les populations de vecteurs. Aucune publication mentionnant clairement les résultats obtenus par ce biais n'a été trouvée.

A l'inverse on peut inonder le sol pour espérer tuer les nématodes. Ces techniques ont montrées des résultats intéressants pour certaines cultures (céleri notamment), mais l'application à la viticulture ne semble pas réalisable. Si la vigne est en place, une inondation prolongée sur plusieurs mois n'est pas envisageable. Les terrains viticoles étant souvent pentus il paraît également compliqué de faire un barrage efficace à l'eau. Ce procédé, ormis pour certaines cultures maraîchères n'a certainement pas d'avenir dans la gestion du court-noué de la vigne. De plus certains rapports ont montré une efficacité intéressante (WEISCHER B., 1975) alors que d'autres avancent de mauvais résultats (Vector of plant viruses, 2008). Au-delà des problèmes de faisabilité, cette lutte est-elle réellement efficace ?

3 - Assainissement par culture in vitro et/ou par thermothérapie

La multiplication végétative a fortement contribué à la propagation des virus chez la vigne. En conséquence, des clones présentant par ailleurs des qualités agronomiques et organoleptiques se trouvent entièrement contaminés. Il peut être intéressant de débarrasser une « tête de clone » des virus qui l'infectent (WALTER B. *et al.*, 2000). Pour cela deux techniques peuvent être utilisées qui sont la thermothérapie et la culture d'apex ou de méristèmes.

a - La thermothérapie

Nous avons vu plus haut, dans la partie sur la sélection clonale, qu'actuellement l'IFV n'utilise plus cette méthode pour purifier des clones. Elle a cependant été pendant longtemps la seule technique permettant de régénérer un clone virosé. L'élimination possible des virus par chauffage est connue depuis presque 70 ans. Les plantes virosées peuvent être traitées par

la chaleur selon deux protocoles. Le premier consiste à traiter des plants cultivés en pots et l'autre s'applique sur des boutures cultivées *in vitro* (WALTER B. *et al.*, 2000). Les plantes en pots sont placées dans des étuves entre 37 et 40°C. Dans ces conditions la réplication des virus est inhibée et les nouvelles pousses peuvent être exemptes de virus. La durée du traitement varie en fonction des virus à éliminer. Par exemple, des protocoles Australiens prévoient 30 jours pour l'élimination du GFLV, alors que 6 mois peuvent être nécessaires pour les virus de l'enroulement à la température de 38°C (NICHOLAS P., 2006). Pour la deuxième méthode, les boutures enracinées en tube sont placées dans un bain-marie à 35°C. Quelque soit la technique choisie, les extrémités des rameaux représentant les nouvelles pousses sont prélevées, puis bouturées et enracinées (WALTER B. *et al.*, 2000). Les temps de traitement n'étant pas calculables de façon précise on prélève les rameaux après des durées croissantes d'exposition à la chaleur.

b - La culture d'apex ou de méristèmes.

Cette technique supplante maintenant la thermothérapie dans les programmes de certification sanitaire. Elle est née de l'observation de l'absence de virus dans les méristèmes de certaines plantes virosées. Des variétés de plantes potagères (pomme de terre), de fruits (fraisiers) ou de plantes ornementales (Dahlia, œillets) ont été régénérées par culture de fragments apicaux exempts de virus. Cette méthode a été adoptée en viticulture notamment face à l'impossibilité d'éliminer certains virus par thermothérapie, puisqu'il aurait fallu chauffer à des températures létales pour la vigne. Le fragment prélevé est de toute petite taille. Il s'agit soit uniquement du méristème, soit du méristème avec 2 ou 3 ébauches foliaires de la partie sous-jacente que l'on appelle l'apex (WALTER B. *et al.*, 2000). Ce fragment est cultivé sur un milieu stérile contenant des substances de croissance. Plus le fragment est petit, plus la chance d'éliminer les virus est grande. Par contre, la chance de réussir à régénérer une plantule diminue avec la taille du prélèvement. Des techniques de fragmentation des apex peuvent être utilisées pour améliorer les résultats (NICHOLAS P., 2006). Le conservatoire des clones Australiens utilise par exemple la fragmentation d'apex en morceau de 1 mm cultivés aux températures de 27 et 35°C. Cette méthode est maintenant très utilisée aux antipodes et donne de très bons résultats (NICHOLAS P. 2006). Une autre amélioration consiste à effectuer un micro-greffage d'apex sur un hypocotyle de plant de semis ou sur un hypocotyle d'embryons somatiques (site officiel IFV, 2009). C'est la technique utilisée

actuellement par l'IFV pour assainir les clones virosés présentant un intérêt agronomique. La culture de vrais méristèmes chez la vigne reste aléatoire et se limite à quelques cépages (WALTER B. *et al.*, 2000). L'efficacité de la culture d'apex varie non seulement en fonction de la taille du fragment prélevé mais aussi, comme pour la thérapie, en fonction du ou des virus à éliminer et du cépage de la vigne à régénérer.

Il faut également noter que lorsque l'on multiplie *Vitis vinifera* in vitro, un mode de fonctionnement juvénile réapparaît et les pieds replantés au vignoble présentent des modifications par rapport à la plante de départ. Ces changements résident au niveau de la morphologie foliaire et de la mise à fleur. Après traitement, certains clones sont devenus quasiment stériles. Des gradients morphogénétiques ont pu être mis en évidence par l'étude du polymorphisme foliaire. Grâce à ces connaissances, des ceps conformes au type initial ont pu être obtenus en bouturant les extrémités des rameaux modifiés. Pour ce qui concerne la floraison des pieds régénérés, une taille longue peut rétablir une mise à fruit normale (WALTER B. *et al.*, 2000).

Actuellement en France, la culture d'apex permet d'assainir des clones qui disparaîtraient complètement de notre patrimoine sans ce « sauvetage ». L'IFV a ainsi assaini 15 clones par microgreffage en 2007.

4 - L'hybridation et/ou la transgénèse dans le but d'obtenir des porte-greffes résistants.

Initialement fondée uniquement sur l'hybridation, la recherche de porte-greffe résistants aux virus du court-noué et/ou aux piqures des *Xiphinema* s'oriente indubitablement vers l'utilisation de la transgénèse. Un article résumant l'état des connaissances en 2004, publié dans un bulletin de l'OIV, fait une synthèse de l'état d'avancement des recherches dans le domaine (BOUQUET A. *et al.*, 2004). Nous allons résumer ici les principales données de ce texte en commençant tout d'abord par détailler les résistances au GFLV, puis à *X. index* et un troisième paragraphe soutiendra l'intérêt de combiner les méthodes traditionnelles d'hybridation et la transgénèse dans le but d'obtenir une protection totale et durable. Enfin, nous dirons quelques mots sur les risques environnementaux et sanitaires liés à l'utilisation des plantes transgéniques résistantes aux virus.

a - Résistances naturelles et transgéniques au GFLV et autres népovirus.

La recherche de sources de résistance naturelles au GFLV dans le germoplasme des *Vitis* a été un échec en France. Des espèces américaines de *Vitis* ont décrites immunes aux *Nepovirus* américains PRMV, TRSV, et ToRSV, alors que *V. vinifera* et hybrides interspécifiques peuvent être très sensibles à ces virus. Une résistance au GFLV a été mise en évidence chez un cultivar de *Muscadinia rotundifolia*, un hybride *V. vinifera* X *M. rotundifolia* et un *V. vinifera* du Moyen-orient (WALTER B. *et al.*, 2000). Cependant, leur utilisation en sélection n'a pas eu de suite car elles se sont révélées sensibles à la souche F13 du GFLV suite à des inoculations par greffages en vert ou microgreffages. Ceci a permis de mettre en cause la variabilité du pathogène dans les phénomènes de résistance.

En France, la transformation génétique d'embryons somatiques de vigne a permis d'introduire le gène de la coque protéique du GFLV (souche F13) dans plusieurs porte-greffes. Cette technique de génie génétique est appelée concept de résistance dérivée du pathogène. Ces approches consistent à isoler des fragments du génome viral et à les introduire dans le génome de plantes afin de stimuler l'extinction de l'expression génique, un phénomène naturel de défense contre les virus qui conduit à une destruction spécifique du génome viral par la plante. Cette nouvelle stratégie de lutte contre les virus a fait son entrée depuis une douzaine d'années dans la pratique agricole aux Etats-Unis d'Amérique (FUCHS M., 2008). Des résultats positifs ont été obtenus également aux états-unis. Cependant, l'efficacité d'une stratégie de résistance dérivée du pathogène n'a toujours pas été démontrée chez la vigne, tant pour le GFLV que pour l'ArMV. Les essais de transformation génétique français ont porté sur les cépages *Vitis rupestris* du Lot, 110 Richter (*Vitis berlandieri* X *Vitis rupestris*), SO4 (*Vitis riparia* X *Vitis berlandieri*) et 41B (*Vitis vinifera* X *Vitis berlandieri*). Une parcelle expérimentale avec les porte-greffes 41B transgéniques obtenus a été mise en place en Champagne en 1997 et a du être arrachée en 1999 sous une pression médiatique mensongère organisée par les partisans d'une interdiction généralisée des OGM. Certaines lignées ont montré un retard très significatif à l'infection mais la durée de l'essai était trop courte pour conclure à une résistance durable. Un dossier pour la reprise de l'expérimentation en milieu non confiné et la mise en place d'un dispositif de biovigilance a été présenté par l'INRA à la commission du génie biomoléculaire siégeant au ministère de l'agriculture. Les

résultats de cet essai en condition naturel, s'il peut être mené à bien, sera très important pour l'avenir de la lutte contre le GFLV par résistance dérivée du pathogène (INRA, 2004).

D'autre part, les lignées transgéniques de 110 Richter exprimant le gène de la coque protéique du GFLV se sont révélées sensibles au virus après deux ans de culture sous serres de confinement dans des sols infectieux.

La faible efficacité chez la vigne d'une stratégie de résistance fondée sur la coque protéique du GFLV ou d'autres népovirus pourrait être due au mode d'inoculation par nématode. En effet, ceci a été démontré à plusieurs reprises sur des plants de tabac transgéniques qui développaient une résistance lorsqu'ils étaient inoculés mécaniquement et n'étaient pas résistants si la transmission du virus se faisait par les nématodes, vecteurs naturels.

b - Résistance naturelle aux nématodes vecteurs de virus.

L'étude du comportement vis-à-vis des nématodes révèle que plusieurs variétés de *Vitis* et de *Muscadinia* sont non-hôtes de *Xiphinema index*, vecteur de GFLV. Il a été démontré que certaines de ces variétés réagissent aux piqûres de nématodes par une hypersensibilité qui se traduit par la nécrose et la mort des cellules piquées (WALTER B. *et al.*, 2000). Le déterminisme génétique de cette résistance est aujourd'hui connu, ce qui ouvre des portes pour la lutte transgénique. Cependant, chez ces porte-greffes et espèces de Vitacées, il semble que dans la plupart des cas, cette réaction ne suffise pas à empêcher l'infection virale. Par la suite, certaines variétés de *Muscadinia rotundifolia* ont été décrites comme résistantes à la transmission du GFLV par *X. index*. Aujourd'hui, nous pouvons donc dire que la résistance au nématode *X.index* n'est pas associée à une résistance à la transmission de la maladie du court-noué, à l'exception de l'espèce *Vitis (Muscadinia) rotundifolia*. Sa résistance très élevée au nématode lui confère une résistance totale à la transmission du GFLV. Par contre, aucune des sélections de *M. rotundifolia* n'a été résistante à la transmission par greffage de ce virus (greffage en vert). Le problème est que cette espèce n'est pas utilisable directement comme porte-greffe, en raison du très mauvais enracinement de ses boutures ligneuses, de sa sensibilité exacerbée à la chlorose calcaire et surtout de son incompatibilité au greffage avec *Vitis vinifera* (espèce à laquelle appartiennent les cépages). L'idée a donc été de créer des hybrides entre *Vitis vinifera* et *Muscadinia rotundifolia*.

En Californie, 3 hybrides F1 *Vitis vinifera* X *M. rotundifolia* créés en 1948 ont été sélectionnées et expérimentés en sol contaminé. Deux d'entre eux (039-16 et 043-43) ont présenté une résistance intéressante. Cependant, ces portes-greffe n'ont pas pu être utilisés, l'un à cause d'une trop faible résistance au phylloxéra (043-43) et l'autre (039-16) à cause de défauts culturaux (capacité d'enracinement). De plus, la durabilité de la résistance au court-noué de 039-16 a été mise en doute. Des travaux sont maintenant en cours sur la base d'hybridation entre *V. riparia* et *M. rotundifolia* (*Vitis riparia* est très résistant au phylloxéra) et les phénomènes génétiques induits par l'hybridation commencent à être compris.

En France, après un travail de sélection de plus de 25 ans, et en dépit de la stérilité élevée des hybrides *V. vinifera* X *M. rotundifolia*, la résistance à *X. index* a pu être introduite dans des géotypes de *Vitis* potentiellement utilisables comme porte-greffes résistants à la dissémination du GFLV. Un de ces géotypes (VMH 3146-1-87) a été obtenu en recroisant par le porte-greffe 140 Ruggeri (*V. berlandieri* X *V. rupestris*) un hybride F1 *V. vinifera* X *M. rotundifolia* résistant à *X. index* et partiellement fertile. Ce géotype présente une résistance à *X. index* intermédiaire entre les deux parents et sa résistance à *X. diversicaudatum* était encore à l'étude en 2004 à l'INRA d'Antibes. Il a été greffé avec la variété Cabernet-Sauvignon et planté en 1999 dans une parcelle fortement infectée par le court-noué. Les résultats ont montré un retard très significatif dans la contamination des ceps, comparativement au porte-greffe SO4 utilisé comme témoin au bout de 4 ans. Les qualités culturales de ce porte-greffe ne sont pas totalement satisfaisantes et des croisements doivent être effectués qui pourraient entraîner un affaiblissement de la résistance à *X. index*. Ce problème est important, d'autant que la résistance n'est déjà pas totale. Cela suppose que des techniques de transformation génétique seront nécessaires pour améliorer ce porte-greffe.

D'autres essais d'hybridation ont été réalisés avec des espèces originaires du sud-est des Etats-Unis qui semblaient intéressantes, notamment *V. rufoomentosa*. Ces hybridations n'ont rien donné.

Par contre, *V. cinerea* croisée avec *V. riparia* a donné naissance, en Allemagne, au porte-greffe Börner. Sa résistance au phylloxéra est incontestable, mais sa résistance à *X. index* est controversée. D'après Bernard WALTER ce porte-greffe est même très favorable à la multiplication du GFLV et la transmet rapidement au greffon.

Des essais sont menés actuellement à Bordeaux afin d'identifier dans le genre *Vitis* des gènes de résistance à *X. index* susceptibles d'être associés à ceux de *M. rotundifolia*. Les tests portent sur les espèces américaines *V. aestivalis*, *V. bicolor*, *V. candidans*, *V. cinerea* et *V. rubra*.

c - Combinaison résistance vecteur / résistance virus et combinaison des techniques d'hybridation et de transgénèse.

Nous comprenons que la recherche d'une résistance totale et durable à la transmission des virus du court-noué doit s'orienter vers une combinaison des méthodes d'hybridation et des méthodes biotechnologiques.

Plusieurs stratégies complémentaires sont à envisager :

- La première consiste à renforcer la résistance à *X. index* issue de *V. rotundifolia* en lui associant une ou plusieurs résistances issues d'autres espèces de *Vitis*.
- La deuxième stratégie envisageable serait de renforcer la (ou les) résistance(s) naturelle(s) à *X. index*, par l'introduction par transformation génétique de gènes codant des protéines capables de perturber l'alimentation et la reproduction du nématode. Pour l'instant cette utilisation de la transgénèse n'est pas envisagée en France.
- La troisième stratégie, actuellement développée à l'INRA de Montpellier consiste à associer aux gènes de résistance à *X. index*, issus de *M. rotundifolia*, une résistance au virus dérivée du pathogène viv-à-vis du GFLV, mais également vis-à-vis de l'ArMV, s'il s'avère que l'hybride VMH 3146-1-87 est également résistant à *X. diversicaudatum*.

Quel est l'état actuel des recherches dans le monde ?

Actuellement, la stratégie d'amélioration du porte-greffe VMH 3146-1-87 a donné de bons résultats et son évaluation est en cours sur un réseau de parcelles en France pour une inscription à la bibliothèque des clones prévue en 2011.

En Allemagne, les recherches portent sur un travail d'analyse des ressources génétiques pour l'amélioration du porte-greffe Börner.

Aux USA, 5 nouveaux porte-greffe ont été inscrit dont 4 sont intéressants pour leur résistance au nématode. L'un deux (UCD GRN-2TM (9363-16)) paraît avoir une résistance accrue à *X. index* (OLLAT N. *et al.*, 2009).

d - Y-a-t'il des risques à l'utilisation des plantes transgéniques résistantes aux virus.

Dans le chapitre sur la diversité génétique des isolats du GFLV et de l'ArMV nous avons frôlé du doigt le problème de la sécurité dans le cadre de l'introduction des vignes transgéniques en plein champ. Nous allons maintenant essayer de comprendre pourquoi ce problème se pose.

Ce chapitre n'a bien sûr pas vocation à résoudre la polémique tournant autour des risques de la transgénèse pour l'homme et l'environnement. Il s'agit simplement de décrire très succinctement quels sont les mécanismes pouvant induire ces risques. Les connaissances actuelles sont résumées dans un article de Marc FUCHS publiées dans la revue *virologie* en 2008 (FUCHS M., 2008).

Il existe trois grands mécanismes qui pourraient être un problème à l'introduction et à l'expression de séquences d'origine virales dans le génome des plantes.

Le premier cas à envisager concerne les plantes transgéniques exprimant un gène viral codant une protéine. La protéine virale pourrait alors conférer une propriété nouvelle à un virus apparenté qui infecte la plante transgénique. C'est ce que l'on appelle la complémentation fonctionnelle. Dans ce cas, la protéine de capsid exprimée par la plante transgénique peut encapsider partiellement ou entièrement l'ARN du virus infectant. On appelle ce phénomène la transencapsidation. Cette interaction peut modifier l'aptitude de transmission d'un virus par un vecteur parce que la protéine de capsid porte généralement, comme c'est le cas pour le GFLV et l'ArMV, les déterminants de la spécificité de transmission. On peut également envisager qu'une protéine exprimée par la plante transgénique puisse compléter une protéine mutée non fonctionnelle. Des études de biosécurité montrent que la vraisemblance de tels phénomènes est faible et que les dommages éventuels sont négligeables. De plus, la complémentation fonctionnelle n'aurait quasiment aucune chance de survenir avec des transgènes viraux qui ne codent pas une protéine fonctionnelle, et c'est le cas dans la lutte contre les virus.

Le deuxième point concerne la possibilité de recombinaisons entre les ARN messagers du gène viral introduit dans la plante et l'information génétique d'un virus infectant. Dans ce cas, les modifications affectent le génome viral et, par conséquent, elles sont transmises à la descendance virale. Elles peuvent éventuellement favoriser l'émergence de nouvelles espèces virales ou changer les propriétés biologiques de virus existant, y compris leur pathogénicité,

leur gamme d'hôte et leur spécificité de transmission par les vecteurs. A ce jour, les études réalisées au champ n'ont pas permis d'obtenir de virus recombinant (cf diversité génétique des virus du court-noué). Des phénomènes de recombinaison surviennent pourtant naturellement chez les virus et sont impliqués dans leur évolution. Vraisemblablement que ce type d'échange d'information génétique est davantage réduit avec l'utilisation de plantes transgéniques par un phénomène bien connu maintenant, appelé extinction de l'expression génique, qui correspond à une destruction de l'ARN au niveau post-transcriptionnel.

Enfin, le troisième item critique concerne le risque de flux des transgènes. Ces flux peuvent avoir lieu par dispersion du pollen d'une espèce transgénique cultivée à une espèce sauvage apparentée. Les hybrides obtenus peuvent devenir résistants à l'infection virale et ainsi acquérir un avantage sélectif et éventuellement une capacité accrue de colonisation. Par conséquent, le flux de transgènes viraux pourrait favoriser l'émergence d'adventices qui perturberaient certains écosystèmes et menaceraient la biodiversité. Des transferts de transgènes d'origine virale ont déjà été mis en évidence. Pour l'instant, les études réalisées, bien que nombreuses, ne permettent pas de trancher sur la possibilité d'une influence des transgènes sur les adventices. Qu'en sera-t-il dans l'avenir ?

Pour ce qui est des risques sanitaires, il s'agit de savoir si les gènes d'origine virale peuvent accentuer les problèmes d'allergénicité s'ils contiennent des acides aminés et des épitopes identiques aux protéines allergènes. Il semble à ce jour que les risques soient très peu vraisemblables, d'autant que l'on mange des fruits et légumes virosés dans l'alimentation courante et qu'aucun cas d'allergénicité ni de toxicité pour l'homme n'a été mis en évidence.

En conclusion, on peut dire que la lutte contre le court-noué ne doit plus être basée sur la méthode de désinfection chimique des sols vu sa toxicité, son efficacité insuffisante et son interdiction probable à venir. Il faut donc développer des alternatives pour remplacer cette lutte chimique qui présente quand même l'avantage d'éviter la mort des ceps juste après replantation. Actuellement, la seule méthode de lutte réellement efficace contre cette maladie est la sélection sanitaire qui permet de planter du matériel végétal sain. Cependant, les contraintes économiques poussent les viticulteurs à replanter dans des terrains infectieux. La seule alternative à des périodes de jachère d'au moins 8 ans pour obtenir un sol dépourvu de nématodes capables de transmettre les virus du court-noué est la création de porte-greffe totalement résistants à la maladie. Ceci ne sera réalisable qu'avec l'intervention de la transgénèse. Dans ce contexte il est important de bien mesurer les risques que pourrait engendrer la modification génétique des plants. En parallèle, pour que cela puisse être fait, il

faut que la communauté scientifique soit entendue et obtienne les autorisations nécessaires aux expérimentations. Enfin, pour clore ce chapitre sur les méthodes de lutte nous pouvons reprendre une phrase de Marc FUCHS qui dit : « L'avenir est incertain sans innovation ; toute innovation présente un risque et il n'y a aucun progrès sans risque » (FUCHS M., 2008).

CONCLUSION

Malgré la grande rapidité avec laquelle les scientifiques évoluent à ce jour dans la connaissance du court-noué de la vigne, et de façon plus générale dans la connaissance des maladies à virus, le viticulteur reste toujours démuni face à une vigne infectée par une virose. En effet, il ne peut éradiquer la maladie de ses parcelles atteintes grâce à un traitement efficace comme c'est le cas pour les ravageurs ou les maladies cryptogamiques. La seule solution qu'il peut mettre en œuvre est la plantation de matériel sain et elle n'est efficace que si elle s'inscrit dans une lutte visant à éliminer les nématodes virulifères. Cette dernière étant très souvent insurmontable sur le plan économique, il s'agit aujourd'hui d'envisager de nouvelles perspectives de lutte rendant les vignes résistantes à la maladie. En plus des techniques d'hybridation et de transgénèse citées dans le document, une nouvelle voie de recherche consistant à stimuler les réactions de défense de la vigne paraît très prometteuse à ce jour. Les mécanismes de l'hypersensibilité ainsi que ceux de la stimulation des gènes codant les protéines de l'immunité font l'objet de nombreuses études pour être mieux compris et exploités. L'idéal serait de parvenir à stimuler des gènes dont les produits sont les moins spécifiques possible pour introduire une protection vis-à-vis d'une large gamme de pathogènes non seulement viraux, mais aussi fongiques ou bactériens.

ANNEXES

ⓐ Normes OEPP ♦

schemas de certification

Certification sanitaire des variEtEs et porte-greffe de la vigne

PM 4/8(1) Français

Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes

1, rue Le Nôtre, 75016 Paris, France

APPRObation

Les Normes OEPP sont approuvées par le Conseil de l'OEPP. La date d'approbation figure dans chaque norme.

ReviSION

Les normes OEPP sont sujettes à des révisions et des amendements périodiques. La prochaine date de révision de cette série de Normes OEPP est décidée par le Groupe de travail pour l'étude de la réglementation phytosanitaire.

enregistrement des amendements

Des amendements seront préparés si nécessaire, numérotés et datés. Les dates de révision figurent (si nécessaire) dans chaque norme individuelle.

Distribution

Les Normes OEPP sont distribuées par le Secrétariat de l'OEPP à tous les Etats membres de l'OEPP. Des copies sont disponibles, sous certaines conditions, auprès du Secrétariat de l'OEPP pour toute personne intéressée.

champ d'application

Les schémas de certification et de classification de l'OEPP sont destinés aux Organisations Nationales de Protection des Végétaux ou aux organismes équivalents, en leur qualité d'autorités responsables de la mise en place de systèmes de production de végétaux sains destinés à la plantation, de l'inspection des végétaux proposés pour la certification phytosanitaire, et de la délivrance des certificats appropriés.

References

OEPP/EPPO (1991) Recommandations du Conseil de l'OEPP en 1990: schéma pour la production de plantes ornementales, à multiplication végétative, certifiées 'pathogen-tested'. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **21**, 740.

OEPP/EPPO (1992) Recommandations du Conseil de l'OEPP en 1981: certification virologique des arbres fruitiers, greffons et porte-greffe. *Documents techniques de l'OEPP* n° 1013, 10-11.

OEPP/EPPO (1993) Recommandations du Conseil de l'OEPP en 1992: schéma pour la production de matériel classifié de plantes ornementales multipliées par voie végétative et répondant aux normes sanitaires. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **23**, 729-730.

definitions

Filiation: Lignée d'une plante à partir d'un parent identifié.

Matériel certifié: Matériel produit à partir du matériel de propagation dans des conditions adéquates.

Matériel de propagation: Matériel issu de la multiplication du matériel initial, dans des conditions garantissant l'absence de contamination. L'absence de pathogènes est contrôlée selon une procédure appropriée. Le matériel issu du matériel de propagation dans les mêmes conditions reste du matériel de propagation, mais, en fonction de l'espèce végétale concernée, un nombre maximum de générations peut être déterminé à ce stade.

Matériel initial: Matériel testé individuellement à l'aide des procédures les plus rigoureuses du schéma. Le matériel issu du matériel initial peut rester du matériel initial dans certaines conditions. Tout ce matériel doit être constamment maintenu dans des conditions strictes garantissant l'absence de contamination.

Schéma de certification: Système pour la production par voie végétative de végétaux destinés à la plantation (pour la multiplication ou la commercialisation) obtenus à partir de matériel candidat après plusieurs étapes de multiplication dans des conditions garantissant le respect de normes sanitaires définies. La filiation du matériel est suivie pendant tout le schéma.

Schéma de classification: Système pour la production par voie végétative de végétaux destinés à la plantation (pour la multiplication ou la commercialisation) obtenus à partir de matériel candidat après une ou plusieurs étapes de multiplication dans des conditions garantissant le respect de normes sanitaires définies. Des classes différentes peuvent être définies en fonction des inspections et des tests utilisés, des tolérances appliquées et des précautions prises. La classification ne tient pas compte de la filiation du matériel.

vue d'ensemble

Un schéma de certification ou de classification de l'OEPP décrit, pour une plante cultivée donnée, les étapes de la production par voie végétative de matériel destiné à la plantation, dont l'état sanitaire est attesté par un certificat officiel. La certification et la classification sont des approches alternatives pour la production de matériel sain destiné à la plantation. Dans un schéma de certification, le matériel certifié descend, par un nombre maximum d'étapes, de plantes individuelles, chacune testée et trouvée indemne d'organismes nuisibles, puis maintenue et multipliée dans des conditions strictes empêchant toute recontamination. Dans un schéma de classification, le matériel classifié descend par une ou plusieurs étapes de matériel répondant, en tant que population, à certaines normes sanitaires; ce matériel est maintenu et multiplié dans des conditions minimisant la recontamination. Dans les deux cas, le statut phytosanitaire est attesté par un certificat officiel. L'approche appropriée pour une plante donnée dépend de la prise en compte du coût et des ressources nécessaires, du statut phytosanitaire recherché, des possibilités pratiques de test, du taux de recontamination, de la valeur du matériel final.

Les schémas de certification et de classification de l'OEPP donnent des détails sur la sélection et le maintien du matériel initial, et sur la multiplication de ce matériel en plusieurs étapes dans des conditions assurant le respect de normes sanitaires définies. Les contrôles nécessaires pour les organismes nuisibles concernés sont spécifiés dans le schéma. Des informations sont fournies, au besoin, sur les organismes nuisibles concernés, les pratiques culturales, les méthodes de test et d'inspection, les normes de certification recommandées.

Schéma de certification

Certification sanitaire des variétés et porte-greffe de la vigne

Champ d'application spécifique

Cette norme décrit la certification sanitaire des variétés et porte-greffe de la vigne.

Approbation et amendement spécifiques

Première approbation en septembre 1993.
Edité sous forme de Norme OEPP en 1998.

Le schéma est présenté selon le plan général proposé par le Groupe d'experts OEPP sur la certification sanitaire des cultures fruitières et adopté par le Conseil de l'OEPP (OEPP/EPPO, 1992). Le matériel certifié de vigne destiné à l'exportation doit dans tous les cas satisfaire à la réglementation phytosanitaire des pays importateurs, notamment en ce qui concerne les pathogènes figurant dans le schéma et classés aussi comme organismes de quarantaine.

Sommaire

Schéma général

Définition des catégories de matériel de multiplication

1. Sélection pour la qualité sanitaire et pomologique
2. Maintien du matériel candidat
3. Production du matériel candidat
4. Maintien du matériel initial
5. Matériel de propagation
6. Distribution du matériel de propagation

7. Contrôle de l'utilisation et de l'état du matériel certifié

8. Certification et étiquetage

Annexe I - Directives pour les procédures de test

1. Test sur plantes indicatrices du genre *Vitis*

(a) Greffage à l'anglaise ou en fente en plein champ

(b) Ecussonnage

(c) Greffage mécanique

(d) Greffage en vert

2. Inoculation sur des plantes-hôtes herbacées

3. Test ELISA

4. Détection des maladies individuelles

Court-noué

Dégénérescence de la vigne (népovirus européens)

Enroulement

Complexe du bois strié

Enations

Marbrure

Nécrose des nervures

Mosaïque des nervures

Flavescence dorée

Bois noir et autres jaunisses européennes

Annexe II - Directives sur les mesures sanitaires

1. Thermothérapie

Traitement à l'air chaud

Traitement à l'eau chaude

2. Culture *in vitro* de méristèmes

Tableaux

Tableau 1. Viroses et maladies similaires de la vigne, présentes dans la région OEPP et couvertes par le schéma

Tableau 2. Pathogènes, transmission, répartition et vecteurs des maladies citées dans le tableau 1

Tableau 3. Nématodes vecteurs et vecteurs aériens des maladies de la vigne présentes dans les pays de l'OEPP

Tableau 4. Principales plantes indicatrices pour les viroses et maladies similaires de la vigne

Bibliographie

Schéma général

Pour produire des variétés et des porte-greffe de vigne certifiés, les étapes suivantes doivent être suivies:

1. Sélection selon la qualité pomologique et la qualité sanitaire de plantes individuelles, pour chaque variété de scion ou chaque type de porte-greffe à introduire dans le schéma.
2. Evaluation de l'état sanitaire des plantes sélectionnées visuellement, au moyen de tests; ou production de plantes saines (matériel initial) par thérapie et/ou culture de méristèmes suivie de tests.
3. Maintien du matériel initial (y compris les plantes reconnues saines par un test sélectif) dans des conditions garantissant l'absence de recontamination par des vecteurs aériens ou des vecteurs du sol, avec des tests supplémentaires si nécessaire.
4. Multiplication du matériel initial en une phase (matériel de propagation), dans des conditions garantissant l'absence de recontaminations, avec des tests supplémentaires si nécessaire.
5. Distribution du matériel de propagation aux pépinières.

6. Production de matériel certifié ("virus-tested") dans les pépinières sous contrôle officiel strict, avec examen par échantillonnage de leur état sanitaire par une organisation officielle, au besoin¹.

Les points 1-3 doivent être effectués par le gouvernement, par une organisation officielle, ou sous contrôle officiel strict; les points 4 et 5 sont effectués directement par une organisation officielle ou sous son contrôle; le point 6 simplement sous son contrôle.

Définitions des catégories de matériel de multiplication

1. *Matériel de propagation*. Scions ou plants (pour la vigne, communément appelés matériel de base) directement issus des plantes du matériel initial et cultivés dans des unités de multiplication. Ces plantes sont dans le même état sanitaire que les plantes sources et ne peuvent être délivrées qu'aux pépinières qui possèdent les qualifications nécessaires.

2. *Matériel certifié*. Scions ou plants issus de plantes-mères établies dans des pépinières commerciales à partir du matériel de propagation, et délivrées aux producteurs. La production de nouvelles plantes-mères à partir de vignes-mères certifiées est interdite. Pour le faire, le pépiniériste doit obtenir du nouveau matériel de propagation.

L'authenticité variétale doit être contrôlée et maintenue pour toutes les catégories. Les catégories de matériel de propagation et de matériel certifié garantissent, en plus, l'état sanitaire pour chaque variété de scion, clone ou type de porte-greffe.

1. Sélection pour la qualité sanitaire et pomologique

Sélectionner des pieds de vigne pour chaque variété ou porte-greffe selon des procédures garantissant l'authenticité variétale et une bonne qualité pomologique. S'efforcer de trouver des pieds sans symptômes apparents (ou avec un minimum de symptômes) de maladies infectieuses transmissibles par greffage. Cependant, d'après l'expérience, l'absence de virus, de pathogènes semblables aux virus et de viroïdes est une situation très rare. Par conséquent, la sélection sanitaire doit généralement être accompagnée de procédures d'élimination des maladies.

2. Maintien du matériel candidat

Prélever des boutures sur les vignes sélectionnées et les conserver au froid (par ex. à 2-4°C) jusqu'à leur utilisation. Lorsque les conditions sont favorables (par ex. sols sableux, faibles taux d'infestation par le phylloxera, *Viteus vitifolii*), faire raciner les boutures des variétés de greffons ou de porte-greffe par forçage en serre et transplanter ces boutures racinées au champ. Pour les variétés de scions, on peut aussi écussonner des bourgeons ou rameaux à

bourgeons issus des vignes sélectionnées sur des porte-greffe certifiés (multipliés par voie végétative ou issus de semis). Avant utilisation, les porte-greffe doivent être testés pour garantir l'absence des maladies et des pathogènes mentionnés dans les tableaux 1 et 2. Toutefois, les porte-greffe issus de semis sont considérés comme indemnes de tous virus, pathogènes semblables aux virus, viroïdes et procaryotes, présents dans les pays OEPP.

Le sol doit être indemne de nématodes vecteurs (tableau 3) et les plants de vigne doivent être soigneusement protégés contre les vecteurs aériens (cochenilles et cicadelles citées dans le tableau 3), dans les zones où ceux-ci peuvent être présents. Pour la collection, une distance de sécurité avec les vignobles commerciaux ou les parcelles de vignes-mères n'est pas strictement nécessaire. Cependant, il faut éviter que la collection et d'autres parcelles de vigne soient contiguës.

3. Production de matériel initial

Pour devenir du matériel initial, les vignes sélectionnées doivent subir des tests pour détecter les maladies et pathogènes dangereux qui sont présents dans la région OEPP (tableaux 1 et 2), et/ou une amélioration sanitaire grâce aux procédures décrites dans les annexes I et II. Le matériel d'importation ne provenant pas de la région OEPP doit aussi être testé selon des méthodes recommandées par l'OEPP pour tous les autres virus et pathogènes semblables aux virus présents chez *Vitis* dans la région d'origine. Les tests sur plantes indicatrices ligneuses, cités dans le tableau 4, sont essentiels pour le matériel qui sera qualifié d'initial, alors que les autres méthodes citées à l'annexe I peuvent servir au criblage préliminaire ou à la répétition des tests. Sans tenir compte du type de thérapie utilisé, les vignes ayant subi une amélioration sanitaire doivent être retestées. Planter les explants racinés ayant subi une thérapie ou provenant de culture de tissus dans des pots séparés, et les cultiver en serre ou sous un abri insect-proof pour garantir l'absence de vecteurs aériens. Si une croissance vigoureuse est obtenue, les tests sérologiques et sur plantes indicatrices ligneuses peuvent être réalisés dans l'année qui suit la transplantation. Si une plante candidate au stade matériel initial, correspondant à une variété ou un à porte-greffe donné, présente des résultats négatifs pour tous les tests, elle peut être considérée comme matériel initial, puis transférée dans la collection de matériel initial.

Si, pour une variété ou un porte-greffe donné, on s'attend à trouver 100% de contamination par des virus, il vaut mieux ne pas perdre du temps avec les premiers tests mais passer directement à l'amélioration sanitaire.

Inspections concernant d'autres organismes nuisibles

En plus des maladies et des pathogènes mentionnés ci-dessus, tout le matériel doit aussi être contrôlé pour vérifier l'absence d'autres organismes nuisibles qui pourraient être véhiculés par le matériel de propagation et en altérer la qualité. En particulier, ceci doit être vérifié pour le crown gall (*Agrobacterium tumefaciens*), *Xylophilus ampelinus*, les maladies du bois (*Phomopsis viticola*, *Eutypa* spp., *Stereum* spp.) et pour les acariens (*Calepitrimerus vitis*,

Panonychus ulmi, *Eotretanynchus carpini*). A noter que des contaminations latentes par *A. tumefaciens* peuvent se produire.

4. Maintien du matériel initial

Mettre en pot (individuellement) un nombre limité de plantes (2-5) pour chaque source (clone) de chaque type de variété ou de porte-greffe, et les placer dans des conditions de culture garantissant l'absence de recontamination par les vecteurs aériens ou vecteurs du sol. A cet effet, les abris 'insect-proof', munis d'une double porte, avec sol recouvert de gravillons, de bâche plastique, de toile goudronnée ou de tout autre matériau évitant le contact entre les racines et la terre, sont appropriés. Les plantes du matériel initial doivent être constamment surveillées et traitées régulièrement avec les produits phytosanitaires adéquats, afin de lutter contre les organismes nuisibles classiques de la vigne (organismes de qualité).

La conservation *in vitro* d'une série de réserve pour tout matériel initial pourra être envisagée lorsque des méthodes fiables de conservation *in vitro* de matériel génétique de *Vitis* seront mises au point.

Les plants de vigne de la collection de matériel initial doivent être contrôlés tous les ans pour vérifier l'absence de symptômes de virus ou d'autres désordres d'origine pathologique. Les tests seront renouvelés si des méthodes de détection, des plantes indicatrices ou des antisérums nouveaux et plus efficaces deviennent disponibles, ou si les inspections visuelles semblent en indiquer la nécessité.

5. Matériel de propagation

Les parcelles de propagation sont établies à l'extérieur, avec du matériel directement issu du matériel initial, et constituent la source pour le matériel de propagation. Elles doivent être situées de préférence sur des sols où la vigne n'a jamais été cultivée, ou sur des sols où la vigne n'a pas été cultivée depuis 6 ans au moins, ces sols étant dans tous les cas indemnes de nématodes vecteurs de virus (tableau 3). Les parcelles doivent être séparées de tout vignoble comportant du matériel d'une catégorie inférieure (certifié), par une distance de 1520 m qui peut être réduite si le sol des champs adjacents (vignobles ou vergers) a été trouvé indemne de nématodes vecteurs de virus.

(a) *Porte-greffe*. Placer les boutures provenant de chaque type de porte-greffe (appartenant au matériel initial) dans une serre, pour les faire raciner, et transplanter directement au champ les boutures racinées. Chaque provenance doit correspondre à une parcelle ou à un rang, et doit être étiquetée pour pouvoir être aisément distinguée des autres.

(b) *Variétés*. Greffer chaque variété prise en compte dans le schéma sur des porte-greffe appartenant à un même niveau de certification, ou sur des porte-greffe issus de semis, et transplanter les plants de vigne greffés au champ.

Tous les ans, contrôler visuellement ce matériel pour vérifier l'absence de symptômes de maladies transmissibles par greffage et le retester si les inspections visuelles semblent le demander.

6. Distribution du matériel de propagation et production de matériel certifié

(a) *Variétés*. Distribuer aux pépinières sous strict contrôle officiel les scions issus des parcelles de propagation. Si possible, une organisation officielle ou officiellement autorisée devrait effectuer cette distribution. Dans les pépinières de production de plantes-mères de vigne, à partir desquelles sera issu le matériel de propagation certifié, les scions seront greffés seulement sur des porte-greffe appartenant à la catégorie de matériel de propagation. Les pépinières doivent déclarer, tous les ans, leur production de matériel certifié auprès de l'organisation officielle concernée, en notant le nombre de plants pour chaque combinaison variété/porte-greffe et en prouvant l'origine des greffons et des porte-greffe certifiés, au moyen de certificats, factures ou fiches de livraison comportant les indications nécessaires.

(b) *Porte-greffe*. Distribuer aux pépinières, sous strict contrôle officiel, les boutures racinées qui deviendront des plantes-mères de vigne destinées à la production de boutures (ou de boutures racinées) certifiées. Si possible, une organisation officielle ou officiellement agréée effectuera cette distribution. La production de porte-greffe certifiés doit être déclarée par les pépinières auprès de l'organisation officielle concernée. Les pépinières doivent noter le nombre de plantes-mères et prouver l'origine du matériel certifié, au moyen de certificats, factures ou fiches de livraison comportant les indications nécessaires.

Les vignes-mères destinées à la production de matériel certifié (scions, boutures racinées de porte-greffe, vignes greffées) doivent être plantées dans des parcelles éloignées d'au moins 8-10 m d'autres vignobles ou vergers, et dans des sols indemnes de nématodes vecteurs de virus. A cet effet, les pépinières doivent produire un certificat d'analyse nématologique, délivré par une organisation officielle ou officiellement agréée.

7. Contrôle de l'utilisation et de l'état du matériel certifié

Dans les pépinières, l'utilisation du matériel de propagation pour produire du matériel certifié doit être surveillée par une organisation officielle ou officiellement agréée, qui contrôle l'état sanitaire, l'origine et la quantité de plants certifiés par des inspections au champ et au vu des informations et des documents fournis par la pépinière. Tout au long de la production du matériel certifié dans les pépinières, des tests par sondage pour détecter les virus doivent aussi être réalisés par des méthodes rapides (par ex. test ELISA, greffage en vert).

8. Certification et étiquetage

Les autorités responsables de la certification délivrent aux pépinières des certificats sur la base des points 4, 5 et 6 et fournissent le nombre d'étiquettes nécessaires. Les vignes greffées et les boutures racinées de porte-greffe sont classées par la pépinière et étiquetées par paquets. Les autorités inspecteront et vérifieront l'étiquetage avant la vente.

ANNEXE I

Directives pour les procédures de test

1. Tests sur plantes indicatrices du genre *Vitis*

L'utilisation de plantes indicatrices du genre *Vitis* reste une étape obligatoire du programme de certification de la vigne. Elle ne peut être exclue, en raison de l'existence d'un certain nombre de maladies (dont certaines sont importantes) qui ne peuvent être identifiées qu'avec l'utilisation d'hôtes ligneux différentiels. Les tests sont effectués par greffage sur les plantes indicatrices listées dans le tableau 4. Puisque au minimum trois répétitions pour chaque variété ou type de porte-greffe entrant dans le schéma sont greffées sur chaque indicateur, 12-18 greffons au total sont nécessaires pour chaque plant de vigne candidat. Plusieurs techniques de greffage peuvent être utilisées:

- (a) *Greffage à l'anglaise ou en fente en plein champ*
- (b) *Ecussonnage* Cette technique est recommandée pour la détection du rupestris stem pitting car les striures induites par la maladie se développent sous le greffon sur la plante indicatrice, et s'étendent de façon basipète en formant une bande.
- (c) *Greffage mécanique*
- (d) *Greffage en vert* (Walter *et al.*, 1990)

Il est admis que le greffage en vert présente des avantages considérables par rapport aux autres méthodes. Par conséquent, un effort doit être fait pour encourager son utilisation.

2. Inoculation sur des plantes-hôtes herbacées

L'utilisation de plantes indicatrices herbacées permet la détection de virus mécaniquement transmissibles (tableau 2), y compris certains virus de moindre importance, voire négligeables. Alors que tous les efforts doivent être faits pour obtenir du matériel initial et de propagation indemne de tous ces virus, l'inoculation sur des hôtes herbacés est considérée comme une méthode complémentaire des autres procédures de diagnostic; elle ne peut leur être substituée. Cette méthode peut être utile notamment pour un criblage préliminaire ou pour des vérifications effectuées au hasard.

3. Test ELISA

L'utilisation du test ELISA est recommandée pour le grapevine fanleaf nepovirus et les autres népovirus européens dans les zones où ils sont présents, et pour les clostérovirus pour lesquels on dispose d'antisérum. Le test peut aussi être appliqué pour détecter le grapevine phloem-limited isometric virus (Boscia *et al.*, 1990). Les antigènes pour les tests ELISA peuvent provenir des bourgeons, des racines, des feuilles ou des morceaux de bois de vigne. Les morceaux de bois présentent certains avantages: (i) ils peuvent être utilisés toute l'année, sans perte apparente d'efficacité liée aux variations saisonnières du taux d'antigène dans les organes végétatifs; (ii) ils donnent un bruit de fond faible et constant; (iii) ils sont beaucoup plus fiables pour l'identification des clostérovirus sur les porte-greffe américains, en particulier *Vitis rupestris* et ses hybrides. L'utilisation du test ELISA peut être considérée comme un complément aux autres méthodes de diagnostic, sans toutefois pouvoir les remplacer. Il peut servir notamment pour un criblage préliminaire ou pour des vérifications effectuées au hasard.

4. Détection des maladies individuelles

Court-noué

Transmission par greffage

Plante indicatrice: *Vitis rupestris* St George

Nb. de plantes/test: 3-5 boutures racinées

Inoculum: Ecussons de bois, bourgeons isolés, rameaux à bourgeons, extrémité de pousses

Température: 22-24°C

Symptômes: (a) Symptômes de la phase aiguë (choc). Taches chlorotiques, anneaux et lignes, nécroses localisées 3-4 semaines après le greffage (écussonnage ou greffage en vert).

(b) Symptômes chroniques. Croissance réduite, feuilles sévèrement déformées avec des dents plus aiguës (souches déformantes), décolorations jaune vif et légère déformation des feuilles (souches chromogènes).

Transmission à des plantes herbacées

Hôte utilisé: *Gomphrena globosa*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*

Inoculum: Tissus de jeunes feuilles présentant des symptômes, ou tissus de racines succulentes

Extraction: Broyer dans une solution de nicotine à 2,5%

Température: Inférieure à 25°C

Symptômes: Lésions locales chlorotiques devenant rapidement rougeâtres au bout de 7-8 j, déformations des feuilles supérieures au bout de 10-12 j (*G. globosa*). Lésions locales chlorotiques sur les feuilles inoculées au bout d'une semaine environ, suivies d'une marbrure systémique et d'une légère déformation des feuilles (*Chenopodium* spp.)

Autres tests

Sérologie (ELISA, ISEM). Sondes moléculaires.

Dégénérescence de la vigne (népovirus européens)

Transmission par greffage

Plante indicatrice: Plusieurs cépages de *Vitis vinifera*: Pinot noir, Jubileum 75 (GCMV); Siegfriedrebe (ArMV, RRV, TBRV)

Nb. de plantes/test: 3-5 boutures racinées

Inoculum: Ecussons de bois, bourgeons isolés, rameaux à bourgeons, extrémités de pousses

Température: 22-24°C

Symptômes: Rabougrissement sévère et nécrose de l'apex sur Pinot noir au cours de la deuxième année de végétation (GCMV); décolorations foliaires et déformations des rameaux sur Siegfriedrebe durant l'année qui suit l'inoculation.

Transmission à des plantes herbacées

Hôtes utilisés: *Datura stramonium* (GCMV)

Chenopodium quinoa (TBRV et GBLV)

Nicotiana clevelandii (RRV)

Cucumis sativus (SLRV)

Nicotiana glutinosa (ArMV)

Inoculum: Tissus de jeunes feuilles présentant des symptômes

Extraction: Broyer dans une solution aqueuse de nicotine à 2,5%

Température: Inférieure à 25°C

Symptômes: *D. stramonium* (CGMV), taches jaunâtres délimitées, systémiques, transitoires.

C. quinoa (TBRV), lésions locales nécrotiques au bout de 6-8 j suivies d'une mosaïque et d'une nécrose de l'extrémité de la plante au bout de 2 semaines

C. quinoa (GBLV), lésions locales nécrotiques au bout de 3-4 j, marbrure chlorotique et nécrose systémiques.

Nicotiana clevelandii (RRV), taches et anneaux nécrotiques locaux au bout de 5-7 j, nécrose des nervures systémique.

Cucumis sativus (SLRV), lésions locales chlorotiques au bout de 57 j, chlorose ou nécrose internervaire systémique au bout de 10-12 j.

Nicotiana glutinosa (ArMV), anneaux chlorotiques.

Autres tests

Sérologie (ELISA, ISEM). Des sondes moléculaires sont en cours de développement.

Enroulement

Transmission par greffage

Plantes indicatrices: Plusieurs cépages rouges de *V. vinifera* (Pinot noir, Cabernet franc, Merlot, Barbera, Mission)

Nb. de plantes/test: 3-5 boutures racinées

Inoculum: Ecussons de bois, bourgeons, rameaux à bourgeons, extrémités des pousses

Température: 22°C (greffage en vert)

Symptômes: Enroulement et rougissement des feuilles au bout de 4-6 semaines (greffage en vert) ou de 6-8 mois à 2 ans (test en plein champ)

Transmission à des plantes herbacées (grapevine closterovirus A)

Hôte utilisé: *Nicotiana clevelandii* ou *N. benthamiana*

Inoculum: Préparations virales purifiées à partir de feuilles de vigne ou de tissus corticaux; cicadelles virulifères; tissus de jeunes feuilles (seulement pour certains isolats de virus)

Extraction: Broyer les tissus foliaires dans une solution aqueuse à 2,5% de nicotine

Température: Inférieure à 25°C

Symptômes: Eclaircissement et jaunissement systémique des nervures au bout de 10-12 j

Autres tests

Sérologie (ELISA, ISEM) et "Western blot" pour les clostérovirus pour lesquels des antisérums sont disponibles. Electrophorèse PAGE pour les profils d'ARN bicaténaire. Des sondes moléculaires sont en cours de développement.

Complexe du bois strié

Transmission par greffage

Plante indicatrice: *V. rupestris* St George: rupestris stem pitting

LN 33: écorce liégeuse (corky bark)

Kober 5BB: Kober stem grooving

LN 33: LN 33 stem grooving

Nb. de plantes/test: 3-5 boutures racinées

Inoculum: Ecussons de bois ou bourgeons isolés (recommandé pour le rupestris stem pitting), rameaux à bourgeons

Température: 22°C (greffage en vert)

Symptômes: Striure basipète sous le point de greffe (rupestris stem pitting), gonflement entre les noeuds et cannelure du bois sur LN 33 (écorce liégeuse); cannelure du bois sur Kober 5BB seulement (Kober stem grooving); cannelure du bois sur LN 33 seulement (LN 33 stem grooving).

Enations

Transmission par greffage

Plante indicatrice: LN 33 ou *V. vinifera* cv. Italia

Nb. de plantes/test: 3-5 boutures racinées

Inoculum: Bourgeons isolés, rameaux à bourgeons

Température: Conditions de plein champ

Symptômes: Enations et déformation des feuilles, 1-3 ans après le greffage.

Marbrure

Transmission par greffage

Plante indicatrice: *Vitis rupestris* St George

Nb. de plantes/test: 3-5 boutures racinées

Inoculum: Ecussons de bois, bourgeons isolés, rameaux à bourgeons, extrémités de pousses

Température: 22°C (greffage en vert ou chambre climatique)

Symptômes: Eclaircissement des nervures secondaires au bout de 4-6 semaines en fonction des conditions de culture

Autres tests

Sérologie (ELISA).

Nécrose des nervures

Transmission par greffage

Plante indicatrice: *Vitis* hybride 110R américain

Nb. de plantes/test: 3-5 boutures racinées

Inoculum: Ecussons de bois, bourgeons isolés, rameaux à bourgeons, extrémités de pousses

Température: 26°C (greffage en vert)

Symptômes: Nécrose des nervures secondaires, rabougrissement et nécrose de l'extrémité des pousses.

Mosaïque des nervures

Transmission par greffage

Plante indicatrice: *Vitis riparia*

Nb. de plantes/test: 3-5 boutures racinées

Inoculum: Ecussons de bois, bourgeons isolés, rameaux à bourgeons, extrémités de pousses

Température: 22°C (greffage en vert)

Symptômes: Taches chlorotiques et mosaïque verte le long des nervures, déformation des feuilles au bout de 4-6 semaines.

Flavescence dorée

Note. Les méthodes indiquées ci-dessous existent, mais seule l'inspection visuelle est actuellement recommandée

Transmission par greffage

Plante indicatrice: Hybride Baco 22A et *V. vinifera* cv. Chardonnay, Aramon

Nb. de plantes/test: 3-5 boutures racinées

Inoculum: Ecussons de bois, bourgeons isolés, rameaux à bourgeons

Température: Conditions de plein champ

Symptômes: Rabougrissement, jaunissement des feuilles et nécrose (cépages blancs),
rougissement des feuilles et nécrose (cépages rouges), 2-3 mois ou plus après
l'inoculation

Autres tests

Sérologie (ELISA).

Bois noir et autres jaunisses européennes

Note. Les méthodes indiquées ci-dessous existent, mais seule l'inspection visuelle est
actuellement recommandée

Transmission par greffage

Plante indicatrice: *Vitis vinifera* cv. Chardonnay, Riesling

Nb. de plantes/test: 3-5 boutures racinées

Inoculum: Ecussons de bois, bourgeons isolés, rameaux à bourgeons

Température: Conditions de plein champ

Symptômes: Jaunissement ou rougissement des feuilles et enroulement du limbe suivis d'une
nécrose des nervures, habituellement au cours de la première année suivant
l'inoculation.

ANNEXE II

Directives sur les mesures sanitaires

1. Thermothérapie

Tous les agents infectieux de la vigne connus pour être transmissibles par greffage, à
l'exception des viroïdes, peuvent être éliminés par thermothérapie des diverses parties des
plantes infectées, mais avec des niveaux d'efficacité variables. Quelle que soit la procédure de
thermothérapie utilisée, l'état sanitaire du matériel traité doit être vérifié par la suite. Le
traitement du matériel doit être séparé de l'enregistrement des résultats des tests virologiques
par un intervalle suffisant pour éviter les faux résultats négatifs.

Traitement à l'air chaud

(a) Sélectionner des plants de vigne cultivés en pot et en croissance végétative (par ex. boutures racinées âgées de 2 ans ou plus), appartenant à chaque variété ou type de porte-greffe à prendre en compte dans le schéma, et les placer dans une chambre climatique, où sera maintenue une température constante de $38\pm 1^\circ\text{C}$, avec un éclairage journalier de 1618 h.

Au moins 4 semaines après le début du traitement (jusqu'à 300 j si les vignes survivent), prélever des extrémités de pousses de 0,5-1 cm de long, et les faire raciner sur un lit de sable chauffé (25°C), sous brumisation, ou dans un milieu nutritif gélosé dans des conditions stériles et après avoir désinfecté la surface des explants.

Repiquer en pot les explants racinés et les laisser pousser en serre jusqu'à ce qu'ils soient prêts pour les tests.

Pour plus d'informations, voir Goheen & Luhn (1973), Martelli (1979), Ottenwaelter *et al.* (1973), Stellmach (1980).

(b) Greffer un bourgeon issu du plant de vigne à traiter sur la pousse principale d'un indicateur (LN 33) sain, âgé de 2 ans et cultivé en pot. Transférer le LN 33 ainsi greffé dans une chambre climatique 12-15 j après le greffage et le laisser pendant 60 j à $37\pm 1^\circ\text{C}$. Sortir les plants traités de la chambre climatique, couper la pousse du LN 33 au-dessus du point de greffage, laisser le bourgeon développer une pousse et contrôler son état sanitaire.

Pour plus de détails, voir Goheen (1977).

Traitement à l'eau chaude

Le traitement à l'eau chaude est utilisé pour éliminer des boutures de vigne les procaryotes intracellulaires comme le MLO responsable de la flavescence dorée. Collecter des boutures dormantes et les plonger dans l'eau, en suivant la méthode de Caudwell *et al.* (1991).

2. Culture in vitro de méristèmes

Prélever des extrémités de pousses ou des bourgeons axillaires sur des plants de vigne cultivés à $36-38^\circ\text{C}$, désinfecter en surface les explants en les trempant pendant 20 min dans une solution commerciale à 5% d'hypochlorite de sodium et 0,1% de Tween 20. Rincer abondamment 2-3 fois (10 min pour chaque rinçage) avec de l'eau distillée stérile.

Prélever des explants de 0,4-0,6 mm de long comprenant le dôme méristématique et la première paire de primordia foliaires et les transférer dans des tubes stériles contenant le milieu gélosé de Murashige et Skoog additionné de 0,5 ppm de benzylaminopurine. Laisser les explants se développer pendant 45 j à 25°C dans une chambre climatique avec un éclairage artificiel journalier de 16 h (environ 4000 lux).

Sélectionner les pousses en croissance active et les transférer individuellement sur un milieu contenant 1 ppm de benzylaminopurine pendant 45-50 j d'élongation. Transférer individuellement les pousses (3 noeuds ou plus) sur un milieu contenant 0,5-1 ppm d'acide

indolbutyrique pour la production de racines. Transférer les explants racinés dans des godets contenant de la vermiculite, dans des conditions d'humidité saturante, puis dans des pots contenant du compost; protéger les plants avec un sac plastique aussi longtemps que nécessaire (généralement 2-3 semaines). Cultiver ces jeunes plants en serre jusqu'à ce qu'ils soient prêts à être testés.

Pour plus de détails, voir Barlass *et al.* (1982).

Bibliographie

Barlass, M., Skeene, K.G.M., Woodham, R.C. & Krake, L.R. (1982) Regeneration of virus-free grapevines using *in vitro* apical culture. *Annals of Applied Biology* **101**, 291-295.

Boscia, D., Savino, V., Elicio, V., Jebahi, S.D. & Martelli, G.P. (1990) Detection of closteroviruses in grapevine tissues. In *Proceedings of the 10th Meeting of ICVG*. Volos (GR).

Caudwell, A., Larrue, J., Volot, C. & Grenan, S. (1991) Hot-water treatment against flavescence dorée on dormant wood. In *Proceedings of the 10th Meeting of ICVG*. Volos (GR).

Goheen, A.C. (1977) Virus and virus-like diseases of grapes. *HortScience* **12**, 465-469.

Goheen, A.C. & Luhn, C.F. (1973) Heat inactivation of viruses in grapes. *Rivista di Patologia Vegetale* **9**, 287-289.

Martelli, G.P. (1979) Identification of virus diseases of grapevine and production of disease-free plants. *Vitis* **18**, 127-136.

OEPP/EPPO (1992) Recommendations made by EPPO Council in 1981: certification of virus-tested fruit trees, scions and rootstocks. *EPPO Technical Documents* no. 1013, 42-43.

Ottenwaelter, M.M., Hevin, H. & Doazan, J.P. (1973) Amélioration du rendement du bouturage des extrémités après thermothérapie sur plantes en pots par l'utilisation de la culture sur milieu gélosé stérile. *Vitis* **12**, 46-48.

Stellmach, G. (1980) Moderate heat propagation of grapevines for elimination of graft transmissible disorders. In *Proceedings of the 7th Meeting of ICVG*, pp. 325-328. Agriculture Canada, Ottawa (CA).

Walter, B. & Etienne, L. (1987) Detection of the grapevine fanleaf virus away from the period of vegetation. *Journal of Phytopathology* **120**, 355-364.

Walter, B., Bass, P., Legin, R., Vernoy, R., Collas, A. & Vesselle, G. (1990) The use of a green grafting technique for the detection of virus-like disease of the grapevine. *Journal of Phytopathology* **128**, 137-145.

Tableau 1. Viroses et maladies similaires de la vigne, présentes dans la région OEPP et couvertes par le schéma (voir tableau 2 pour plus de détails)

1. Complexe des maladies de dégénérescence de la vigne, provoquées par le grapevine fanleaf nepovirus (court-noué) et autres nepovirus européens
2. Complexe de l'enroulement de la vigne
3. Complexe de la maladie du bois strié (écorce liégeuse, rupestris stem pitting, Kober stem grooving, LN 33 stem grooving)
4. Maladie de la marbrure de la vigne
5. Maladie des étiations de la vigne
6. Maladies à clostérovirus de la vigne (le matériel dans lequel des clostérovirus ont été identifiés n'est pas admis pour la certification)
7. Maladies de la vigne provoquées par des MLO (inspection visuelle seulement - le matériel visiblement contaminé par des MLO n'est pas admis pour la certification)

Les autres maladies transmissibles par greffage, reconnues comme présentes dans la région OEPP, sont tolérées pour le moment, mais il faudrait s'efforcer d'assurer leur élimination en particulier pour les maladies de la mosaïque des nervures et de la nécrose des nervures.

Tableau 2. Pathogènes, transmission, répartition, et vecteurs des maladies citées dans le tableau 1

Virus		Répartition	Vecteur
A. Complexe des dégénérescences de la vigne (toutes mécaniquement transmissibles)			
1.	Artichoke Italian latent nepovirus (AILV)	Bulgarie	<i>Longidorus apulus</i> <i>Longidorus fasciatus</i>
2.	Arabis mosaic nepovirus (ArMV)	Europe (Suisse, Allemagne, Hongrie, Yougoslavie, Bulgarie,	<i>Xiphinema diversicaudatum</i>

		France, Italie), Japon	
3.	Grapevine Bulgarian latent nepovirus (GBLV)	Bulgarie, Hongrie, Portugal Yougoslavie	Inconnu

Tableau 2 (suite)

4.	Grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMV)	Hongrie, Yougoslavie	Inconnu
5.	Grapevine fanleaf nepovirus (GFLV)	Mondiale	<i>Xiphinema index</i> <i>Xiphinema italiae</i>
6.	Grapevine Tunisian ringspot nepovirus (GTRV)	Tunisie	Inconnu
7.	Raspberry ringspot nepovirus (RRV)	Allemagne	<i>Longidorus macrosoma</i> <i>Longidorus elongatus</i>
8.	Strawberry latent ringspot nepovirus (SLRV)	Allemagne, Italie, Turquie	<i>Xiphinema diversicaudatum</i>
9.	Tomato black ring nepovirus (TBRV)	Allemagne, Israël, Canada (Ontario) Hongrie	<i>Longidorus attenuatus</i> <i>Longidorus elongatus</i>
B. Complexe de l'enroulement de la vigne (seul le grapevine closterovirus A est transmissible mécaniquement)			
10.	Grapevine closterovirus A	Europe, Méditerranée	<i>Planococcus ficus</i> <i>Planococcus citri</i> <i>Pseudococcus longispinus</i>
11.	Grapevine leafroll-associated closterovirus I	Europe, Méditerranée, USA	Inconnu
12.	Grapevine leafroll-associated closterovirus II	Europe, Méditerranée	Inconnu
13.	Grapevine leafroll-associated closterovirus III	Europe, Méditerranée, USA	<i>Planococcus ficus</i> <i>Pseudococcus longispinus</i>

14.	Grapevine leafroll-associated closterovirus IV	Méditerranée, USA	Inconnu
15.	Grapevine leafroll-associated closterovirus V	France	Inconnu
Deux autres clostérovirus, associés à l'enroulement, ont été trouvés et semblent sérologiquement différents de ceux qui figurent ci-dessus.			
<i>C. Complexe du bois strié (non transmissible mécaniquement)</i>			
Présent dans le monde entier et de vecteur inconnu. Les maladies connues sous le nom d'écorce liégeuse (corky bark), rupestris stem pitting, Kober stem grooving et LN 33 stem grooving appartiennent à ce complexe. Aucun pathogène associé à ce complexe n'a encore été caractérisé, mais un clostérovirus sérologiquement différent des clostérovirus associés à l'enroulement a été signalé en association avec la maladie de l'écorce liégeuse.			
<i>D. Maladie de la marbrure (non transmissible mécaniquement)</i>			
16.	Grapevine phloem-limited isometric virus (GPLIV)	Europe, Méditerranée	Inconnu
<i>E. Maladie des étiations (non transmissible mécaniquement)</i>			
La maladie est présente en Europe, Amérique du Nord (USA), Amérique du Sud (Venezuela), Afrique du Sud, Nouvelle-Zélande, Australie, mais de vecteur inconnu. Aucun pathogène associé à cette maladie n'a encore été identifié.			
<i>F. Maladies de la vigne provoquées par des MLO</i>			
17.	Grapevine flavescence dorée MLO	France, Italie	<i>Scaphoideus titanus</i>
18.	Grapevine bois noir et autres jaunisses (MLOs)	Europe (France, Allemagne, Italie, Suisse, Grèce, Roumanie, Bulgarie), Chili, Israël, Nouvelle-Zélande	Inconnu (probabl. cicadelles)

Tableau 3. Nématodes vecteurs et vecteurs aériens des maladies de la vigne présentes dans les pays de l'OEPP

Vecteur	Pathogène	Répartition
<i>Xiphinema index</i>	Grapevine fanleaf nepovirus	Sur vigne partout au monde
<i>Xiphinema italiae</i>	? ¹	Zone méditerranéenne
<i>Xiphinema diversicaudatum</i>	Arabis mosaic nepovirus Strawberry latent ringspot nepovirus	Partout en Europe et Moyen-Orient
<i>Longidorus attenuatus</i>	Tomato black ring nepovirus	Répartition éparse en Europe, mais plutôt dans le centre-nord, soit en PL, DE, NL, BE, GB (Angleterre)
<i>Longidorus elongatus</i>		Principalement en Europe septentrionale mais rarement aussi en ES, IT, BG et sud de FR
<i>Longidorus macrosoma</i>	Raspberry ringspot nepovirus	Europe occidentale
<i>Xiphinema vuittenezi</i>	? ²	Europe centrale et méridionale principalement
<i>Planococcus ficus</i>	Grapevine closterovirus A Grapevine leafroll-associated closterovirus III	Zone méditerranéenne
<i>Planococcus citri</i>	Grapevine closterovirus A	Zone méditerranéenne
<i>Pseudococcus longispinus</i>	Grapevine closterovirus A Grapevine leafroll-associated closterovirus III	Zone méditerranéenne
<i>Scaphoides titanus</i>	Grapevine flavescence dorée MLO	Introduit dans sud-ouest de l'Europe à partir d'Amérique du Nord, et en extension vers l'est

¹ Bien que dans la littérature *Xiphinema italiae* ait été signalé comme vecteur du grapevine fanleaf nepovirus, il ne semble pas capable de transmettre la maladie au champ.

² Il n'a pas été prouvé expérimentalement que *X. vuittenezi* pouvait transmettre des virus. Néanmoins, il a été trouvé associé lors de la dissémination de certains népovirus au champ (par ex. le grapevine chrome mosaic nepovirus). C'est la raison pour laquelle il doit être considéré comme un nématode potentiellement dangereux.

Tableau 4. Principales plantes indicatrices pour les viroses et maladies similaires de la vigne¹

Plantes indicatrices	Maladie identifiée
1. <i>Vitis rupestris</i> St George	Dégénérescence ² , marbrure, rupestris stem pitting
2. <i>Vitis vinifera</i> Cabernet franc, Pinot noir et autres cépages rouges	Enroulement ³
3. Kober 5BB (<i>Vitis berlandieri</i> × <i>Vitis riparia</i>)	Kober stem grooving
4. LN 33 (Couderc 1613 × <i>Vitis berlandieri</i>)	Ecorce liégeuse, énation, LN33 stem grooving
5. <i>Vitis riparia</i> Gloire de Montpellier	Mosaïque des nervures ⁴
6. 110 R (<i>Vitis rupestris</i> × <i>V. berlandieri</i>)	Nécrose des nervures ⁴

¹ L'annexe I donne le détail des tests et propose un certain nombre d'autres plantes indicatrices.

² Dans les pays où la dégénérescence est provoquée par des népovirus autres que le grapevine fanleaf nepovirus, Siegfriedrebe (FS4 201/39) peut être utilisé comme plante indicatrice.

³ Le choix de la plante indicatrice la mieux appropriée pour l'enroulement dépend des conditions climatiques de la région où les tests sont effectués.

⁴ Comme indiqué au tableau 1, ces plantes indicatrices sont optionnelles pour le moment mais sont fortement recommandées.

1 Le matériel de vigne certifié destiné à l'exportation devra dans tous les cas, répondre à la réglementation phytosanitaire des pays importateurs, en particulier pour tout ce qui concerne les pathogènes mentionnés dans le schéma qui sont aussi des organismes de quarantaine.

TABLES DES TABLEAUX

Tableau 1 - Les virus de la vigne et leur classification systématique (source : BOUDIEU- PADIEU E. et al)	22
Tableau 2 : Nepovirus (et Sadwavirus) responsables de dégénérescence et de dépérissement infectieux.	28
Tableau 3 – Plantes hôtes de <i>X. index</i> et <i>X. diversicaudatum</i> * plante hôte du GFLV, ** plante hôte de l'ArMV (ESMANJAUD 2000).....	139
Tableau 4 : Inventaire sanitaire du parc des vignes mères de porte-greffe. (Source : DEMANGEAT G. et al., 2005 (c)).	150
Tableau 5 : Inventaire sanitaire du parc de vignes mères de greffons. (Source : DEMANGEAT G. et al., 2005 (c)).	150
Tableau 6 : Variétés indicatrices recommandées pour le dépistage et l'identification des principales viroses de la vigne (source : extended abstract 15th meeting ICVG, 2006).....	159
Tableau 7 : Variation de la réponse ELISA pour le dépistage du GFLV dans de vignes en fonction de la date de prelevement des échantillons des feuilles dans les conditions climatiques de Colmar. (d'après WALTER B. et al., 2000).....	180
Tableau 8 : viroses principales et secondaires recherchées par sélection sanitaire (IFV France, 2009)	193
Tableau 9 : pourcentage de recontamination d'une parcelle infectée en fonction du de repos laissé au sol (VUITTENEZ et al., 1969).....	203
Tableau 10 : effets des nématocides seuls et associés à une dévitalisation des souches (DESCOTE A., MONCOMBLE D., 1995).....	207
Tableau 11 : effets des nématocides seuls et associés à une dévitalisation des souches (Source : Station Fédérale de Recherches Agronomiques de Chagny, Rapport d'activité 1994).....	208

TABLE DES PHOTOGRAPHIES

Photo 1 : symptômes sévères d'enroulement sur merlot (photo : BOVEY R., source ICVG)	32
Photo 2 : symptômes de bois strié uniquement sur greffon. (Photo MARTELLI G.-P., 1993)	34
Photo 3 : symptômes uniquement sur porte-greffe. (Photo MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006).....	34
Photo 4 : porte-greffe et greffon développent les symptômes. (Photo MARTELLI G.-P., 1993).....	35
Photo 5 : apparence liégeoise de l'écorce et épaissement au dessus du point de greffe (photo : MARTELLI G.-P.)	35
Photo 6 : RSP. Extension basipète des cannelures depuis le point d'inoculation. (Photo : GOHEEN A.C.)	36
Photo 7 : Symptômes sévères de Corky barck. Rabougrissement et rougissement des feuilles. (Photo MARTELLI G.-P., 1993).....	36
Photo 8 : Raccourcissement et éclatement typique des entre-nœuds dans un Corky Barck sévère. (Photo : MARTELLI G.-P., 1993).....	37
Photo 9 : Cannelures sur le porte-greffe Kobber 5 BB. (Photo : MARTELLI G.-P., 1993).....	37
Photo 10 : Eclaircissement typique des nervures sur Vitis rupestris. (Photo MARTELLI G.-P. dans FAO/IBPGR, 2008)	40
Photo 11 : Asteroid mosaic. Le plissement de la feuille le long des nervures est très remarquable. (Photo MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006)	40
Photo 12 : Incompatibilité au greffage avec rougissement des feuilles et pousses très réduites. Certains assemblages ont disparus totalement. (Photo MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006).....	42
Photo 13 : Mosaïque jaune induite par l'AMV au printemps. (Source : MARTELLI G.-P.).....	44
Photo 14 : Taches jaunes et lignes chlorotiques sur cv. Chardonnay en été. (Source : MARTELLI G.-P.).....	44
Photo 15 : lignes chlorotiques sur un rameau nouvellement infecté (cv. Jubileum 75). (Source : MARTELLI G.-P.)	45
Photo 16 : Anneaux et lignes chlorotiques typiques associés au Line pattern disease. (Source : MARTELLI G.-P.)	45
Photo 17 : Décolorations sectorielles et jaunissement des nervures associé au rougissement des bords du limbe sur cv. Roditis. (Source : MARTELLI G.-P.).....	46
Photo 18 : Intense décolorations autour des nervures typiques de la mosaïque des nervures. (Source : MARTELLI G.-P.)	48
Photo 19 : Vein necrosis ou nécrose des nervures. (Source : Caudwell A. INRA Dijon).....	49
Photo 20 : Enations sur feuilles de la base d'un rameau. (Source FAO/IBPGR, 2008)	50
Photo 21 : Symptômes typiques de moucheture (Source : FAO/IBPGR, 2008)	51
Photo 22 - sinus pétiolaire élargi et dentelure acérée des feuilles. (Source MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006)	56
Photo 23 - exemples de mosaïques vertes (deux feuilles de droite) et taches ou lignes chlorotiques (feuille de droite). L'élargissement du sinus pétiolaire est remarquable. (Source MARTELLI G.-P.)..	57
Photo 24 - déformation sévère des feuilles et rabougrissement de la végétation sur vigne infectée par une souche déformante du GFLV (Source MARTELLI G.-P.)	60
Photo 25 - feuille de vigne avec symptômes typiques du court-noué (Source MARTELLI G.-P.).....	60
Photo 26 - Taches chlorotiques et déformations provoquées par une souche déformante du GFLV. (Source MARTELLI G.-P.).....	61

Photo 27 - Tâches et déformations provoquées par une souche déformante de l'ArMV. (Source MARTELLI G.-P.)	61
Photo 28 – mosaïque jaune (taches) et déformation des feuilles induites par une souche déformante d'un népovirus européen. (Source MARTELLI G.-P.).....	61
Photo 29 – Panachure réticulée provoquée par le GFLV. (Source : Fiches pratiques de l'ITV, 2005) .	62
Photo 30 : fasciation sur rameau + présence d'un double nœud. (Source : SRPV midi-pyrénées, 2005)	62
Photo 31 - Ramification anormale d'un rameau sur vigne infectée. (Source : HYPP pathologie. INRA, 2008)	63
Photo 32 - croissance anormale sur vigne infectée. (Source : SRPV midi-pyrénées, 2005).....	63
Photo 33 – comparaison de grappes issuent d'un cep sain et d'un cep court-noué. (Source MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006).....	64
Photo 34 - A gauche vigne infectée par une souche déformante du GFLV. On remarque l'évergissement très net du sinus pétiolaire. (Source MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006)	64
Photo 35 - jaunissement total de rameaux printaniers d'une vigne infectée par une souche chromogène du GFLV. (Source MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006).....	65
Photo 36 – jaunissement progressif des feuilles d'un rameau. Couleur jaune-chrome caractéristique. (Source : Fiches pratiques de l'IFV, 2008)	65
Photo 37 : anneaux chlorotiques. (Source : fiches pratiques de l'ITV, 2005).....	66
Photo 38 : symptômes de mosaïque jaune sur indicateur Kobber 5BB. (Source : MARTELLI G.-P.) .	66
Photo 39 : symptômes de panachure sur feuille. (Source : SRPV midi-pyrénées, 2005)	67
Photo 40 : cep typique du syndrome en bordure d'un foyer de court-noué (tests ELISA positifs pour le GFLV) On peut remarquer que d'autres ceps sont morts au niveau de ce foyer. (Source : MARTELLI G.-P.).....	67
Photo 41 – Jaunissement total de cep au sein d'un foyer de court-noué. (Source : MARTELLI G.-P.)	67
Photo 42 – couleur chrome caractéristique des atteintes chromatiques dues au court-noué. (Source : Fiches pratiques de l'IFV, 2008).	68
Photo 43 – A : foyer de court-noué présentant des altérations chromatiques / B : réduction de la taille et du nombre des grappes en présence d'un syndrome de mosaïque jaune. Ce symptôme n'est pas systématique comme le montre la différence de récolte entre la photo de droite et de gauche. (Source : ANDRET-LINK P., 2005)	69
Photo 44 – Atténuation des altérations chromatiques virant au blanchâtre. (Source : MARTELLI G.-P.).....	70
Photo 45 - Les feuilles carencées en bore sont boursouflées entre les nervures. Les bords s'enroulent vers l'intérieur et la croissance est perturbée. (Cépage Doral). (source : RYSER <i>et al.</i> , 2007).....	74
Photo 46 - Feuilles des extrémités et des entre-coeurs fortement déformées et restant petites. Raccourcissement important des entre-noeuds. (Cépage Gamay). (source : RYSER <i>et al.</i> , 2007).....	75
Photo 47 - zones claires, jaunâtres aux contours imprécis entre les nervures. Le bord de la feuille devient arrondi, l'aspect dentelé disparaissant progressivement. (Cépage Sylvaner). (source : RYSER <i>et al.</i> , 2007).....	75
Photo 48 - Cas grave avec apparition de nécroses sur les feuilles. Le développement des rameaux et des feuilles est fortement bloqué et déréglé. (Cépage Gamay). (source : RYSER <i>et al.</i> , 2007).....	76
Photo 49 - Coulure importante liée à une carence apparue avant la floraison. (source : RYSER <i>et al.</i> , 2007)	76
Photo 50 - A gauche : jaunissement de la feuille avec nervures vertes. A droite : cas grave avec nécrose. (source : Le guide viti d'agroscope, Changins Wädensvil)	77

Photo 51 : envahissement progressif de l'ensemble de la plante (source : Le guide viti d'agroscope, Changins Wädensvil)	78
Photo 52 - Cas de grave carence magnésienne avec jaunissement quasi total du limbe (source : Le guide viti d'agroscope, Changins Wädensvil)	79
Photo 53 - acariose d'été sur jeune feuille de vigne due à <i>C. vitis</i> (source : HYPPZ, 1997)	80
Photo 54 - Dégâts sur pousse : mérithalles courts, développement en zigzag, zones striées, feuilles en cuillère. (source : BAILLOD M. (LINDER CH. et REMUND U. , 2007)	81
Photo 55 - symptômes de grillures avec nécrose du bord des feuilles. Cette nécrose doit permettre d'éliminer une suspicion de court-noué. (source : Photo INRA).....	82
Photo 56 - Larve vert-clair et exuvies d' <i>Empoasca vitis</i> sur face inférieur d'une feuille attaquée. Leur présence permet d'établir un diagnostic de façon certaine. (source : Photo INRA)	82
Photo 57 - Le cep de droite atteint de Flavescence dorée ne produit pas de raisin, les feuilles sont enroulées et l'on distingue clairement un sarment non aoûté (flèche de gauche). A gauche de ce cep, une plante saine, ainsi qu'en témoignent ses grappes. (Cépage Chasselas). (source : SCHAEERER,2007)	84
Photo 58 - Eutypiose sur un cep de Gamay. Le sarment de gauche est normal, les autres sont "court-noués". (BOLAY A., SIEGFRIED W., 2007)	85
Photo 59 : Dégâts provoqués par le court-noué au sein d'une parcelle. (Source : DEMANGEAT G., 2007)	88
Photo 60 : <i>Xiphinema index</i> (source : HYPPZ. INRA, 2008)	119
Photo 61 : prise alimentaire de <i>X. index</i> par perforation d'une radicelle (source : NC state university)	122
Photo 62 - Greffage sur table en oméga à la pépinière viticole de Vix (Vendée) (Source : Mercier – pépinières viticoles et vignobles).....	160
Photo 63 - greffe en oméga (Source : Mercier – pépinières viticoles et vignobles).	160
Photo 64 - détaille d'une greffe oméga en coupe. (photo : MAIGRE D., 2004).....	161
Photo 65 - serres de stratification (Source : Mercier – pépinières viticoles et vignobles).	161
Photo 66 - caisses de stratification après 14 jours (Source : Mercier – pépinières viticoles et vignobles).....	162
Photo 67 - Assemblages juste après plantation en plein champ, au printemps (Source : Mercier – pépinières viticoles et vignobles).....	162
Photo 68 - Pépinière d'indexage en plein champ. Aucun symptôme n'est visible. (Source : Mercier – pépinières viticoles et vignobles).....	162
Photo 69 - Plant issu de greffe herbacée - Détail du point de greffe (Photo : MAIGRE D., 2004).....	163
Photo 70 - Plant issu de greffe herbacée - Partie supérieure du plant avec point de greffe. (Photo : MAIGRE D., 2004)	164
Photo 71 - Symptômes chroniques sur <i>Vitis rupestris</i> inoculé avec une source « fanleaf ». (Source : MARTELLI G.-P., 1993).....	165
Photo 72 - Décoloration jaune chrome et déformation des feuilles sur <i>Vitis rupestris</i> inoculé avec un greffon présentant des symptômes de mosaïque jaune. (Source : MARTELLI G.-P., 1993)	165
Photo 73 - Symptômes de choc (anneaux et lignes chlorotiques) sur <i>Vitis rupestris</i> inoculé avec une source "fanleaf". (Source : MARTELLI G.-P., 1993)	166
Photo 74 – Récolte de l'extrémité d'un rameau d'une vigne présentant des symptômes de panachure totale pour la préparation d'un extrait. (Photo G.P. MARTELLI)	168
Photo 75 - Hôtes herbacés les plus couramment utilisés pour isolés ou mettre en évidence des phytovirus.....	168
Photo 76 - inoculation à un hôte herbacé à l'aide d'un coton-tige. Les traces blanches sur les feuilles sont des restes de poudre abrasive. (Source : MARTELLI G.-P., 1993)	169

Photo 77 - Panachure systémique induite par le GFLV sur <i>C. amaranticolor</i> (Source : MARTELLI G.-P., 1993).....	169
Photo 78 - Panachure systémique et déformatin des feuilles induite par le GFLV sur <i>C. quinoa</i> (Source : MARTELLI G.-P., 1993).....	170
Photo 79 – Déformation (torsion) typique des feuilles induite par le GFLV sur <i>Gomphrena globosa</i> (Source : MARTELLI G.-P., 1993).....	170
Photo 80 - Mosaique induite par l'ArMV sur <i>C. quinoa</i> (Source : MARTELLI G.-P., 1993).....	171
Photo 81 - Taches et anneaux chlorotiques induits par l'ArMV sur <i>Nicotiana glutinosa</i> . (Source : MARTELLI G.-P., 1993).....	171
Photo 82 : application du nématocide à l'aide d'injecteurs situés à l'extrémité de coutres, suivie d'un bâchage du sol. (Source : vectors of plant viruses, 2008).	206

TABLES DES FIGURES

Figure 1 : Forme et structure des virus des plantes. (source : vectors and plant viruses, 2008).	18
Figure 2 - Structure et expression des ARN 1 et 2 du <i>grapevine fanleaf virus</i> . Un point d'interrogation est associé aux protéines pour lesquelles la fonction suspectée n'a pas été démontrée expérimentalement. (Source : ANDRET-LINK P., 2005).	97
Figure 3 - Représentation dans l'espace de la structure de la protéine de capsid du TRSV. (Source : FUCHS M., 2003 et ANDRET-LINK P., 2005).	99
Figure 4 - représentation de la capsid du TRSV. (Source : ANDRET-LINK P., 2005).	99
Figure 5 : rôle des plasmodesmes au niveau de l'expression génique de deux cellules voisines, en particulier dans le transport des facteurs de transcription. (Source DING B., 1998).	102
Figure 6 : modèle schématique de la structure d'un plasmodesme basée sur des études réalisées sur des cellules de mésophylles et des cellules vasculaires de tabac. Vue médiane longitudinale en haut, et vue en coupe en bas. S : extensions connectant le RE à la membrane plasmique (PM). CW : Cross wall (jonction cellulaire). TC : putative transport channels (canal de transport probable pour les macromolécules). (Source : DING B., 1998)	103
Figure 7 : assemblage de la MP en tubules pour permettre le passage de l'ARN viral. (Source : Université de Tours).	104
Figure 8 : Analyses en CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) des cellules 2B15, 24 heures après induction. (source : LAPORTE <i>et al.</i> , 2003)	106
Figure 9 : Plasmodesmes et tubules de GFP:MP dans les jonctions cellulaires de cellules 2B15 avant et 24h après induction par la dexaméthasone (source : LAPORTE <i>et al.</i> , 2003)	108
Figure 10 : Affinité préférentielle de la protéine GFP:MP pour les parois jeunes et pour la plaque cellulaire (source : LAPORTE <i>et al.</i> , 2003)	109
Figure 11 : Rôle du système endomembranaire et du cytosquelette dans l'adressage de la GFP:MP (source : LAPORTE <i>et al.</i> , 2003)	111
Figure 12 : coupe transverse au niveau de l'odontostyle de <i>Longidorus attenuatus</i> retenant des particules virales de l'AILV. (Source : TAYLOR C.-E. <i>et al.</i> , 1976).	124
Figure 13 : Partie antérieure des <i>Longidoridae</i> (stade larvaire). (Source : DEMANGEAT G., 2007)	124
Figure 14 : Larve de <i>Xiphinema</i> en train de muer (Source : DEMANGEAT G., 2007).	125
Figure 15 : acides aminés responsables de la spécificité de transmission (Polyprotéine P2) (source : ANDRET-LINK P., 2005)	131
Figure 16 : A gauche : modèle 3D de la capsid du GFLV (FUCHS M, 2003). A droite : Schéma de la structure de la 2CCP (ANDRET-LINK P., 2005).	132
Figure 17 : Distribution verticale de <i>X. index</i> dans la parcelle Mesnil et les parcelles Cumières 1 et 2. (Source : ESMENJAUD D. <i>et al.</i> , 1992).	143
Figure 18 : test ELISA indirect (MAGNIEZ F., 2008)	176
Figure 19 : test DAS-ELISA direct (droite) et indirect (gauche). (Source : MAGNIEZ F., 2008).	178
Figure 20 - Pays appartenant à la région OEPP	188
Figure 21 – Organisation de la sélection clonale en France. (Source : IFV France, 2009).	191

BIBLIOGRAPHIE

ABALLAY E., SEPULVEDA R. et INSUNZA V., 2004. Evaluation of five nematode-antagonistic plants used as green manure to control *Xiphinema index* Thorne et Allen on *Vitis vinifera* L. *Nematropica* (34) : 45-51.

ALBOUY J. et DEVERGNE J.-C. virus et viroses . Dans : *Maladie à virus des plantes ornementales 1998*; pp 13-28. Editions INRA.

ANDRET-LINK P., SCHMITT-KEICHINGER C. , DEMANGEAT G. , KOMAR V., et FUCHS M., 2003. The specific transmission of Grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein. *Virology*, 320 : 12–22.

ANDRET-LINK P., LAPORTE C., VALAT L., RITZENHALER C., DEMANGEAT G., VIGNE E., LAVAL V., PFEIFFER P., STUSSI-GARAUD C. et FUCHS M. 2004 (a). Grapevine Fanleaf Virus : still a major threat to the grapevine industry. *Journal of plant pathology*, 86 (3) : 183-195.

ANDRET-LINK P., SCHMITT-KEICHINGER C., DEMANGEAT G., KOMAR V., FUCHS M., 2004 (b). The specific transmission of Grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein. *Virology* 320 : 12-22.

ANDRET-LINK P., 2005. Identification des déterminants viraux responsables de la spécificité de transmission du *Grapevine fanleaf virus* par son nématode vecteur *Xiphinema index*. Thèse de doctorat de l'université Louis Pasteur Strasbourg I, en biologie moléculaire et cellulaire. *UMR 1131 ULP / INRA Santé de la Vigne et Qualité des Vins, Colmar*.

ARNAUD G.,1937. Les maladies à virus des plantes. VI. Maladies à virus de la vigne et court-noué. *Progrès agricole et viticole* 58 (113) : 138-141.

ASTIER S., ALBOUY J., MAURY Y., LECOCQ H., 2001. Principes de virologie végétale. Génome, pouvoir pathogène, écologie des virus. *INRA éditions*.

Australian government, 2004. Review of vine health parameters, implementation priorities and capabilities for vine improvement groups and accredited nurseries. *Final report to : grape and wine research and development corporation*. Research organisation : Scholefield Robinson Horticultural Services Pty Ltd (10 september 2004).

BABINI A.R., CREDI R., GIUNCHEDI, 1982. Effect of viral infections on some grape rootstocks, consiglio nazionale della ricerche : 310-318

BACCARINI P., 1902. Roncet. *Viticulture Moderne* 8 : 241-248.

BALTHAZARD A.,1993. Valeur culturale du Gewurztraminer clone N° 913 guéri du virus de l'enroulement par thérapie. *Progrès Agricole et Viticole*, 110 : 382-385.

- BASHIR N.S., NIKKAH S.**, 2006. Variation in movement protein gene of grapevine fanleaf virus isolates from Iran. *Extended abstracts 15th Meeting ICVG*, Stellenbosch, South Africa, 3 – 7 April 2006, pp 43-44 .
- BASHIR N. S., ZARGHANI S. N. , HEJAZI M. S.**, 2007. Diversity of Grapevine fanleaf virus isolates from Iran. *Virus Research* 128 : 144–148
- BELIN C., SCHMITT C., GAIRE F., WALTER B., DEMANGEAT G., PINCK L.**, 1999 The nine C-terminal residues of the grapevine fanleaf nepovirus movement protein are critical for systemic virus spread. *Journal of general virology*, 80 (6) : 1347-56
- BEN ABDALLAH F., CHEBIL S. et GHORBEL A. W.**, 2003. More about *in vitro* grape symptomatology. *Phytopathol. Mediterr.* (42). 35-40.
- BERTAMINI M., MUTHUCHELIAN K. ET NEDUNCHEZHIAN N.**, 2004. Effect of Grapevine Leafroll on the Photosynthesis of Field Grown Grapevine Plants (*Vitis vinifera* L. cv. Lagrein). *J. Phytopathology* 152 : 145–152
- BITTERLIN M.W. et GONSALVES D.**, 1987. Spatial distribution of *Xiphinema rivesi* and persistence of *Tomato ringspot virus* and its vector in soil. *Plant disease* 71: 408-429.
- BOLAY A. et SIEGFRIED W.**, 2007. L'Eutypiose. Dans : *Fiches de la Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil (ACW)*. Confédération suisse. Département fédéral de l'économie. Fiche 602. 3p.
- BONNET A., TORREGROSA A., BOUBALS D.**, 2000. A new symptomatological form of the grapevine fanleaf virus disease ? Who has seen that? Publication de l'INRA de Montpellier dans : le progress agricole et viticole 117 (22) : 488-490.
- BOUQUET A., TORREGROSA L., CHATELET P.**, 2004. Combinaison des approches biotechnologiques et conventionnelles dans la sélection de porte-greffes présentant une résistance durable à la transmission de la maladie du court-noué. Bulletin de l'OIV (revue internationale) Mai-Juin 2004. (77) 879-880 : 361-376.
- BOVEY R.**, 1958. Etat actuel des connaissances sur les maladies à virus de la vigne. *Vitis* 1 : 237-256.
- BOVEY R., GARTEL W., HEWITT W.B., MARTELLI G.P., VUITTENEZ A.**, 1990. Soil-borne viruses transmitted by nematodes. *Virus and virus-like diseases of grapevines*, pp 46-50. Editions Payot, Lausanne, Suisse.
- BRANAS J., BERNON G., LEVADOUX L.**, 1937. Sur les circonstances qui favorisent le développement du court-noué. *Progrès agricole et viticole* 58 : 161-165.
- BROWN D.J.F.**, 1986. The transmission of two strains of arabis mosaic virus from England by populations of *Xiphinema diversicaudatum* (Nematoda : Dorylaimoidea) from ten countries. *Revue Nématol.* 9 (1) : 83-87

BRUNT A.A., CRABTREE K., DALLWITZ M.J., GIBBS A.J., WATSON L. and ZURCHERE.J. Barley stripe mosaic Hordeivirus. *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database 1996.* URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>

CABI et OEPP, 1995. Fiche informative sur les organismes de quarantaines. Préparé par le CABI et l'OEPP pour l'UE sous Contrat. www.eppo.org/QUARANTINE/virus.pdf

CADMAN C.H., DIAS H.F., HARRISON B.D., 1960. Sap-transmissible viruses associated with diseases of grape vines in Europe and North America. *Nature* 187 : 577-579.

CAZALIS-ALLUT L.Cx., 1865. De la dégénération des vignes. *Ouvres Agricoles*, 57-61.

CAYROL J.C., DJIAN-CAPORALINO C., PANCHAUD-MATTEI E., 2007. La lutte biologique contre les nematodes phytoparasites. *Le courrier de l'environnement de l'INRA*. www.inra.fr/dpenv/pa.htm

CENTRE D'AGRICULTURE DE LA GIRONDE – Service vigne et vin, 2007. Les carences en manganèse : une recrudescence. *Brèves viti-oeno* 22, déc.2007.

CHOLIN J.J., 1896. Beobachtungen über die « Reisigkrankheit » der reben an Ahr. *Mitteilung über Weinbau und Kellerwirtschaft* 8 : 63-64.

CHOVELON M., 2006. Contrôle de *Xiphinema index*, nématode vecteur du court-noué de la vigne. GRAB Avignon. *Viticulture 2006*.

COLIMON. 2001. Département de virologie. CHU de Rennes. Définition d'un virus. <http://www.med.univ-rennes1.fr/resped/s/viro/struc/struc/class.html>

DALMASSO A., 1970. Influence directe de quelques facteurs écologiques sur l'activité biologique et la distribution des espèces françaises de la famille des Longidoridae (*Nematoda* : *Dorylaimida*). *Ann zool Anim.* (2) : 163-200.

DALMASSO A., MUNCK-CARDIN M.C. et LEGIN R., 1972. Résultats préliminaires d'essais de transmission de sérotypes de la mosaïque de l'Arabis trouvés sur vigne, par l'intermédiaire de *X. diversicaudatum*. *Annales de phytopathologie* 4, 410.

DELEMARRE F., 2005. Développement d'une méthode d'échantillonnage pour la répartition spatiale du nématode *Xiphinema index*, vecteur de Grapevine Fanleaf Virus. *Stage de fin d'étude*. Maîtrise de sciences et techniques "expertise et management en environnement". Université du Littoral / côte d'opale. UMR Santé végétale INRA-ENITA.

DEMANGEAT G., Transmission des Nepovirus par les nématodes Longidoridae. *Virologie* 11 (4) : 309-330.

DEMANGEAT G., ANDRET-LINK P., SCHMITT-KEICHINGER C., VIGNE E., KOMAR V., BERGDOLL M. ET FUCHS M., 2006. Domains of the grapevine fanleaf virus coat protein involved in transmission specificity by the nematode vector *Xiphinema index*. *Extended abstracts 15th Meeting ICVG*, Stellenbosch, South Africa, 3 – 7 April 2006, pp 45-46.

DEMANGEAT G., KOMAR V., CORNUET P., ESMENJAUD D., FUCHS M., 2004. A sensitive and reliable detection of *Grapevine fanleaf virus* in a single *Xiphinema index* nematode vector. *Journal of Virological Methods* 122 : 79-86.

DEMANGEAT G., ESMENJAUD D., VOISIN R., 2005 (a). Court-noué de la vigne. Survie de *Xiphinema index* et rétention en l'absence de plante hôte. *Le Vigneron Champenois* 11: 45-52.

DEMANGEAT G., MINOT J.C., VOISIN R., BOSSELUT N., FUCHS M., ESMENJAUD D., 2005 (b). Survival of *Xiphinema index* and retention of *Grapevine fanleaf virus* over extended periods of time in the absence of hosts plants. *Phytopathology* 95: 1151-1157.

DEMANGEAT G., ESMENJAUD D., VOISIN R., BIDAULT J.M., GREANAN S., CLAVERIE M., 2005 (c). Dossier. Le court-noué de la vigne. Etat des connaissances sur cette maladie lors de la journée « alternative » du 28 avril 2005. *Phytoma* 587: 38-42.

Department of agriculture ; Gouvernement of Western Austria, 2006. Common name : Grapevine fanleaf virus. Acronym = GFLV. Scientific name : Class-virus/Nepovirus / Family-Comoviridae. Dans: *Hortguard threat data sheet for the wine and table grape industry in W.A. Reviewed march 2006.*

DESCOINS C, 2005. Le court-noué de la vigne. *Article faisant suite à la journée de travail organisée par l'Institut Rhodanien, l'INRA, l'ENTAV et l'ITV France à Avignon en avril 2005.*

DESCOTE A. et MONCOMBLE D., 1995. Lutte contre le court-noué. *Le vigneron champenois.* (9) : 20-24.

DIAS H.F., 1963. Host range and properties of grapevine fanleaf and grapevine yellow mosaic viruses. *Annals of Applied biology* 51 : 85-95.

DIAS H.F. et HARRISON B.D., 1963. The relationship between grapevine fanleaf, grapevine yellow mosaic and arabis mosaic viruses. *Annals of Applied Biology* 51 : 97-105.

DIGIARO M., ELBEAINO T., MARTELLI G.P., 2007. Development of degenerate and species-specific primers for the differential and simultaneous RT-PCR detection of grapevine-infecting nepoviruses of subgroups A, B and C. *Journal of virological methods* (141) : 34-40.

DING B., ITAYA A., WOO Y. M., MASUTA C., BAO Y., NELSON R., 1998. Intercellular protein trafficking through plasmodesmata, *Plant physiology*, 118 (2) : 373-385

DJIAN-CAPORALINO C., BOURDY G. et CAYROL J.C., 2002. Chapitre 12 : « plantes nématicides et plantes résistantes aux nématodes » dans « Biopesticides d'origine végétale ». *Editions Tec & Doc, Paris, France.* 197-224.

Dow Agrosciences LCC, 2009. Description du thrips.
<http://www.dowagro.com/fr/success4/champs>

DU HAMEL M., 2001. Les agents pathogènes des plantes : champignons, bactéries, virus, viroïdes . Comptes-rendus de l'Académie des sciences. *Série3, Sciences de la vie* 2001 ; 324 (10) : 873-963, 929-933.

ENTAV, Etablissement National Technique pour l'Amélioration de la Viticulture
www.entav.com/FR/selection.htm

EPPO/CABI, 2006. Grapevine flavescence dorée phytoplasma. Fiche informative sur les organismes de quarantaine, 9 pp.
http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Flavescence_doree/PHYP64_ds.pdf

ESMENJAUD D., PISTRE R., BONGIOVANNI M., 1988. Activité nématocide de l'aldicarbe sur sol lourd, en application fractionnée ou non, contre *X. index* Thorne et Allen, 1950 (Nematoda : Longidoridae), vecteur du court-noué de la vigne. *Medel Fac Landbouwwet rijksuniv Gent.* (53) : 855-891.

ESMENJAUD D., WALTER B., VALENTIN G., GUO Z.T., CLUZEAU D., 1992. Vertical distribution and infectious potential of *Xiphinema index* (Thorne et Allen, 1950) (Nematoda : Longidoridae) in fields affected by Grapevine Fanleaf virus in vineyards in the Champagne region of France. *Plant pathology* 12 : 395-399.

ESMENJAUD D., 2000. Les nématodes de la vigne. Dans : *Ravageurs de la vigne. Editions Féret, Bordeaux. France.* 17-29.

ESMENJAUD D., WALTER B., MINOT J. C., VOISIN R., and CORNUET P., 1993. Biotin-avidin ELISA detection of grapevine fanleaf virus in the vector *Xiphinema index*. *Journal of Nematology* (25) : 401-405.

FAO/IBPGR, 2008. Technical guidelines for the safe movement of grapevine germplasm. Report from the Food and agriculture organization of the united nations and the international board for plants genetic resources (in collaboration with ICRG).
www.bioversityinternational.org/Publications/Pdf/429.pdf

FATOUCH S., LEOPOLD S., DA CÂMARA MACHADO A., BORROTO FERNANDEZ E., ALI KHAN M., GAMBINO G., GRIBAUDO I., SCHARTL A., LAIMER A., 2006. Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes: II. *Plant Cell Rep* (2006) 25: 546–553.

FATOUCH S., ACHECHE H., M'HIRSI S. , MELLOULI L., BEJAR S., MARRAKCHI M., MARZOUKI N., 2005. RT-PCR–RFLP for genetic diversity analysis of Tunisian *Grapevine fanleaf virus* isolates in their natural host plants. *Journal of Virological Methods* 127 (2005) :126–132.

FATTOUCH S., M'HIRSI S., ACHECHE H., MARRAKCHI M., MARZOUKI N., 2001. RNA Oligoprobe Capture RT-PCR, a sensitive Method for the Detection of Grapevine Fanleaf Virus in Tunisian Grapevines. *Plant Molecular Biology Reporter* (19) : 235-244.

FEIL H., WESTERDAHL B.B., SMITH R.J., VERDEGAAL P., 1997. Effects of seasonal and site factors on *Xiphinema index* populations in two California Vineyards. *Journal of Nematology* 4 (29) : 491-500.

FERNANDEZ A., GARCIA T., ASENSIO L., RODRIGUEZ M.A., GONZALEZ I., HERNANDEZ P.E., MARTIN R., 2001. PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region for identification of 3 clam species. *Journal of food science* 66 (5) : 657-661.

FINETTI-SIALER M. M. et CIANCIO A., 2005. Isolate-Specific Detection of *Grapevine fanleaf virus* from *Xiphinema index* Through DNA-Based Molecular Probes. *Phytopathology* (95) : 262-268.

FUCHS M., PINCK M., SERGINI M.A., RAVELONANDRO M., WALTER B., PINCK L., 1989. The nucleotide sequence of satellite RNA in Grapevine Fanleaf Virus, strain F13. *Journal of genetic virology*, 70 : 955-962.

FUCHS M., 2003. Etat de la science et avancées des recherches sur les viroses de la vigne. Xe séminaire de la Coordination des REcherches sur Chardonnay Et Pinot. Bourgogne. (CRECEP). Virose de la vigne et maladie du bois. *Première intervention*.

FUCHS M., 2008. Les plantes transgéniques et la lutte contre les virus phytopathogènes : état de l'art et perspectives. *Virologie* 12 (1) : 27-37.

FUCHS M., 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, 2003.. Transgenic resistance: state of the art and perspectives.

GAIRE F., SCHMITT C., STUSSI-GARAUD C., PINCK L., RITZENTHALER C., 1999. Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology* 264 : 25-36.

GUGERLI P., BESSE S., COLOMBI L., RAMEL M.-E., RIGOTTI S. et CAZELLES O., 2006. First outbreak of flavescence dorée in Swiss vineyards. *15th meeting of the international council for the study of virus and virus-like diseases of the grapevine (ICVG)*, SASEV, Stellenbosch, South Africa, extended abstracts, 96-98.

HABILI N. et MONIS J., 2006. Highlights of ICVG 2006 meeting. Advances in research : grapevine viruses. *Practical winery and vineyard December/November 2006*.

HANS F., FUCHS M., PINCK L., 1992. Replication of grapevine fanleaf virus satellite RNA transcripts in *Chenopodium quinoa* protoplasts. *Journal of general virology* 73 : 2517-2523.

HANS F., PINCK M. et PINCK L., 1993. Location of the replication determinants of the satellite RNA associated with grapevine fanleaf nepovirus (strain F13). *Biochimie*. 75 : 597-603.

HARRISON B.D., CADMAN C.H., 1959. Role of a dagger nematode (*Xiphinema sp.*) in out breaks of plant disease caused by Arabis mosaic virus. *Nature*. 184 : 1624-6.

HARRISON B.D., 1964. Specific nematode vectors for serologically distinctive forms of raspberry ringspot and tomato black ring virus. *Virology*. 22 : 544-550.

HERBEIN G., 2003. *cours DCEMI*

www.chu-besancon.fr/virologie/definition_structure_virus.doc

HEWITT W.B., 1950. Fanleaf – Another vine disease found in California. *Bulletin of the California Department of Agriculture*. 43 : 47-64.

HEWITT W.B., RASKI D.J., et GOHEEN A.C., 1958. Nematode vector of soil borne fanleaf virus of grapevines. *Phytopathology* 48 : 586-595.

HEWITT W.B., GOHEEN A.C., RASKI D.J., et GOODING G.V., 1962. Studies on virus diseases of the grapevine in California. *Vitis* 3 : 57-83.

HEWITT W.B., 1985. From virus-like to virus diseases of grapevines : some unresolved problems including immunity and ideas for researching them. *Phytopathologica Mediterranea* 24 : 1-7

HÜBSCHEN J., KLING L., IPACH U., ZINKERNAGEL V., BOSSELUT N., ESMENJAUD D., 2004 (a). Validation of the specificity and sensitivity of species-specific primers that provide a reliable molecular diagnostic for *Xiphinema diversicaudatum*, *X. index* and *X. vuittenezi*. *European Journal of Plant Pathology* (110) : 779–788.

HÜBSCHEN J., KLING L., IPACH U., ZINKERNAGEL V., BROWN D.J.F., NEILSON R., 2004 (b). Developpement and validation of species-specific primers that provide a molecular diagnostic for virus-vector longidorid nematodes and related species in German viticulture. *European Journal of Plant Pathology* (110) : 883 : 91.

HUSS B., MULLER S., SOMMEMEYER G., WALTER B., VAN REGENMORTEL M.H.V., 1987. Grapevine fanleaf virus monoclonal antibodies : their use to distinguish different isolates. *Journal Phytopathology* 119 : 358-370.

HUSS B., WALTER B., FUCHS M., 1989. Cross-protection between arabis mosaic virus and Grapevine fanleaf virus isolates in *Chenopodium quinoa*. *Annuaire of Applied Biology*. 114 : 45-60.

HYPPZ – base de donnée encyclopédique, 1997. Encyclopédie des ravageurs européens. INRA. Fiche *Calepitrimerus vitis*. Phytopte de l'acariose de la vigne, 1997.

ICTVdB Management, 2006. 00.018.0.03. Nepovirus. Dans : ICTVdB – The universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C.(Ed), Columbia University, NY USA.

ICVG Extended abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, South Africa, 3 – 7 April 2006

ICVG Extended abstracts 14th Meeting ICVG, Locorondoto, 12 – 17 september 2003.

IFV, Institut Français de la Vigne et du vin

www.vignevin.com/fileadmin/users/ifv/publications/AffichesIFV/Sel_ClonalePosterJanv09

IZADPANAH K., ZAKI-AGHL M., ZHANG Y. P., DAUBERT S. D., AND ROWHANI A., 2003. Bermuda grass as a potential reservoir host for Grapevine fanleaf virus. *Plant Disease* 87:1179-1182.

JHA A., POSNETT AF., 1959. Transmission of a virus to strawberry plants by a nematode (*Xiphinema sp.*). *Nature* 184 : 962-3.

JOHNSON R.C., 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, 2003. Grapevine certification and the importation of grapevines into the member countries of the North American Plant Protection Organization (NAPPO).

JONES A.T., MITCHELL M.J., BROWN D.J.F., 1989. Infectibility of some new raspberry cultivars with arabis mosaic and raspberry ringspot viruses and further evidence for variation in British isolates of these two nepoviruses. *Annals of applied biology* 115 : 57-69.

LAGHA M., 1992. Serologic characterization of three strains of the grapevine fanleaf virus. *Thèse en agronomie*. Bari (italie).

LAPIERRE H., PIERRE A. SIGNORET, 2005. Viruses and Virus Diseases of Poaceae (Gramineae). Editions INRA. Pp 342-346.

LAPORTE C., VETTER G., LOUDES A. M., ROBINSON D., HILMER S., STUSSI GARAUD C., RITZENHALER C., 2003 Involvement of the Secretory Pathway and the Cytoskeleton in Intracellular Targeting and Tubule Assembly of Grapevine fanleaf virus Movement Protein in Tobacco BY-2 Cells, *Plant Cell*, 15 : 2058-2075.

LEONHARDT W., WAWROSCH C., AUER A. et KOPP B., 1998. Monitoring of virus diseases in Austrian grapevine varieties and virus elimination using *in vitro* thermotherapy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. (52) : 71-74.

LE GALL O., SANFAÇON H., IKEGAMI M., IWANAMI T., JONES T., KARASEV A., LEHTO K., WELLINK J., WETZEL T. & YOSHIKAWA N., 2007. Cheravirus and Sadwavirus : two unassigned genera of plant positive-sense single-stranded RNA viruses formerly considered atypical members of the genus Nepovirus (family Comoviridae). *Archives of Virology* 152 : 1767-1774.

LE GALL O., IWANAMI T., KARASEV AV., et al. Family Comoviridae. Dans : FAUQUET CM., MAYOT MA., MANILOFF J., DESSELBERGER U., BALLS LA., eds. *Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses. 8th Report of the International Committee on Taxonomy Of Viruses*. 2005.

LEPOIVRE P., 2003. Phytopathologie. Ed. De Boeck Université.

LES FICHES PRACTIQUES DE L'ITV.

www.itv-midipyrenees.com/services-professionnels/methode-analyse/court-noue.php

LINDER Ch. et REMUND U., 2007. Le thrips de la vigne. Dans : *Fiches de la Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil (ACW)*. Confédération suisse. Département fédéral de l'économie. Fiche 607. p1. 2007.

MAIGRE D., 2004. Plants produits par greffe herbacée et greffe classique en viticulture. Comparaison du comportement agronomique et œnologique de la vigne adulte. *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic. Vol. 36 (5): 255-261*,

MAGNIEZ F., 2008. La technique ELISA.
biotechnologie.over-blog.com/article-18589062.html

Mc GUIRE J.M., 1973. Retention of Tobacco ringspot virus by *Xiphinema americanum*. *Phytopathology* 63: 324-330.

Mc NAMARA D.G., 1980. The survival of *Xiphinema diversicaudatum* in plant free soil. *Nematologica* 26: 170-251.

Mc NAMARA D.G., 1978. Studies on the ability of the nematode *Xiphinema diversiticaudatum* (Micol.) to transmit raspberry ringspot virus and to survive in plant-free soil. Ph. D. Thesis, univ. of reading; Reading, England.

MANNINI F., 2003. Virus elimination in grapevine and crop performance. Dans : *extraits de 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, 2003*.

MARTELLI G.-P., SAVINO V., 1990. Fanleaf degeneration. Dans : PEARSON R.C and GOHEEN A. (eds.). *Compendium of grape diseases 1990* ; pp. 48-49. APS Press, St. Paul, MN, USA.

MARTELLI G.-P., 1993. Grapevine degeneration – fanleaf. In : Martelli GP. (ed.). Graft transmissible diseases of grapevines. *Handbook for detection and diagnosis*, pp. 9-18. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome, Italy.

MARTELLI G.-P., SAVINO V. (1988). Fanleaf degeneration. Pp 48-49 in *Compendium of Grape Diseases* (R. C. Pearson and A. C. Goheen, Eds). *American Phytopathological Society Press, St Paul, Minnesota*. 93 p.

MARTELLI G.-P. et BOUDON-PADIEU E., 2006. Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and virus-like diseases of the grapevine : bibliographic report 1998-2004. Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes (CIHEAM), Bari, Italie. Dans : *options méditerranéennes, série B : N° 55*.

MARTINSON T., FUCHS M., LOEB G., HOCH H., 2008. Grapevine Leafroll – an increasing problem in the finger lakes, the US and the world. *Rapport du New York State Agricultural Experiment Station*. Cornell University.

MERCIER, Pépinières viticoles et vignobles
<http://www.mercier-groupe.com>

MORIN E., 2007. Gestion du nématode X. index par des cultures intercalaires à effet nématicide. *Rapport de Master. Mention « biologie et technologie du végétal »*. Institut national d’horticulture. Université d’Angers.

MUGNIERY D., 2006. Les nématicides et la lutte chimique contre les nématodes. *Document communiqué directement par l’auteur*.

UNIVERSITÉ DE TOURS. Virus et plantes. Polycopié de cours.
http://microbiologie.univ-tours.fr/uel_virususplantani_poly.pdf

NARAGHI-ARANI P., DAUBERT S., ROWHANI A., 2001. Quasispecies nature of the genome of Grapevine fanleaf virus. *Journal of General Virology*, 82 : 1791–1795.

NICHOLAS P., 2006 (a). Selection of clones for the Australian National Nuclear Grapevine Collection. *Grapegrowing may 2006*.

NICHOLAS P., 2006 (b). Grapevine clones used in Australia. South Australian Research and Development Institute.
www.sardi.sa.gov.au/data/assets/pdf_file/0020/46730/grapevineclonesdec2006.pdf

OLIVEIRA C.M.G., FENTON B., MALLOCH G., BROWN D.J.F., NEILSON R., 2005. Developpement of species-specific primers for the ectoparasitic nematode species *Xiphinema brevicolle*, *X. diffusum*, *X. elongatum*, *X. ifacolum*, and *X. longicaudatum* (Nematoda : Longidoridae) based on ribosomal DNA sequences. *Ann Appl Biol* (146) : 281-289.

OLLAT N., DECROOCQ S., BOUQUET A., 2009. L'amélioration génétique des porte-greffes dans le monde : état actuel des recherches.
www.vineland.org/FR/rapports/2009-03/ollat.pdf

Oregon department of agriculture. ODA Commodity Inspection Division, Plant Health 2007
http://www.oregon.gov/ODA/CID/PLANT_HEALTH/profilebsmv.shtml

OSMAN F., LEUTENEGGER C., GOLINO D., ROWHANI A., 2008. Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time Taq Man® RT-PCR in detection of grapevine viruses. *Journal of virological methods*, (149) : 292-299.

PANTANELLI E., 1912. Résumé en français de : Influence du terrain sur la transmission du court-noué de la vigne. Dans : *Rendiconti Regia Accademia dei Lincei*, S.V. , 19 : 395-401.

PETRI L., 1929. Sulle cause dell' aricciamiento della vite. *Bolletino della Regia Stazione di Patologia Vegetale*, Roma, N.S., 9 : 101-130.

PINCK M., REINBOLT J., LOUDES A.M., LE RETAND M. ET PINCK L., 1991. Primary structure and location of the genome-linked protein (YPg) of grapevine fanleaf nepovirus. *Federation of European Biochemical Societies*. 284 (1) : 117-119.

RASKI D.J., GOHEEN A.C., LIDER L.A., MEREDITH C.P., 1983. Startegies against grapevine fanleaf virus and its nematode vector. *Plant Disease* 67 : 335-339.

RATHAY E., 1882. Die Gabler oder Zwiewipflereben. *Österreiches Botanische Zeitschrift* 32 : 316-320.

RAYNAL G., GONDRAN J., BOURNOVILLE R., COURTILLOT M., Introduction sur les maladies à virus des plantes fourragères. Dans : *Ennemis et maladies des prairies* 1989 ; pp 70-71. Editions INRA.

- REY A.**, Les voies du virus. *Le bulletin de l'ordre des médecins* Mai-Juin 2005 ; n°6.
- RITZENTHALER C., VIRY M., PINCK M., MARGIS R., FUCHS M., PINCK L.**, 1991. Complete nucleotide sequence and organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA1. *Journal of General Virology* 72 : 2357-2365.
- RITZENHALER C., PINCK M. et L.** 1995 grapevine fanleaf nepovirus P38 putative protein is not transiently expressed and is stable finalmaturation product in vivo, *journal of general virology*, 76 : 907-915
- RITZENTHALER C., LAPORTE C., GAIRE F., DUNOYER P., SCHMITT C., DUVAL S., PIEQUET A., LOUDES A.M., ROHFRICTSCH O., STUSSI-GARAUD C., et PFEIFFER P.** 2002 Grapevine Fanleaf Virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes. *Journal Virology*, 76 : 8808-8819.
- RYSER J. P., SCHWARZ J. J., MURISIER F., SPRING J. L., BASLER P. et KOBLET W.**, 2007. La carence en bore de la vigne. Dans : *Fiches de la Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil (ACW)*. Confédération suisse. Département fédéral de l'économie. Fiche 824. p1. 2007.
- SAMPOL B., BOTA J., RIERA D., MEDRANO H. et FLEXAS J.**, 2003. Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. *New phythologist* (2003) 160 : 403 – 412.
- SCHIFF-GIORGINI R.**, 1906. Le court-noué des Vitis américains en Sicile. *Bulletin officiel du ministère de l'agriculture*, N.S., 6 : 971-979.
- SCHNEIDER W.L., ROOSSINCK M.J.**, 2000. Evolutionarily related Sindbislike plant viruses maintain different levels of population diversity in a common host. *Journal of Virology*, 74 : 3130–3134.
- SCOTTO LA MANESE C., MINOT J.C., VOISIN R., CASTAING L.M.R., FABRE A.**, 1988. Influence de la nature du sol, du précédent cultural et de l'âge de la plantation sur la composition et la distribution de la némato-faune associée à la vigne en milieu méditerranéen. *Acta Oenol Appl.* (9) : 137-152.
- SRPV**, 2005. Réglementation phytosanitaire et surveillance sanitaire. Préfecture de la région midi-pyrénées. Virus du court-noué – GFLV et ArMV. *Fiches techniques de reconnaissance*. 2005
srpv.draf-midi-pyrenees@agriculture.gouv.fr
- SRPV - Pays de la Loire**, 2005. Avertissements agricoles. Arrachages en vue de replantation. *Bulletin Technique des Stations d'Avertissements Agricoles n°23 du 24 octobre 2005* – 2 pages.
- TAYLOR C.E. et RASKI D.J.**, 1964. On the transmission of grapevine fanleaf by *Xiphinema* index. *Nematologica* 10 : 489-495.
- TAYLOR C.E., ROBERTSON W.M.**, 1969. The location of raspberry ringspot and tomato blackring viruses in the nematode vector *longidorus elongatus* (de Man). *Ann Appl Biol.* 64 : 233-237

TAYLOR C.E., ROBERTSON W.M., 1970. Sites of virus retention in the alimentary tract of the nematode vectors, *Xiphinema diversicaudatum* (Micol.) and *X. index* (Thorne et Allen). *Ann Appl Biol.* 66 : 375-80

TRUDGILL David L., BROWN Derek J.F., Mc NAMARA David G., 1983. Method and criteria for assessing the transmission of plant viruses by longidorid nematodes. *Revue Nématologica* 6 (1) : 133-141.

VALAT L., FUCHS M., BURRUS M., 2005 Transgenic grapevine rootstock clones expressing the coat protein or movement protein genes of Grapevine fanleaf virus: Characterization and reaction to virus infection upon protoplast electroporation, *Plant Science* 170 : 739-747.

VALLOTON R. et PERRIER J.J., 1990. Les nématodes vecteurs de virus dans le vignoble de Suisse romande et le Tessin. *Rev Suisse Vitic Arboriq Hortiq.* 22 : 53-58.

Vectors of plant viruses, 2008.

<http://plpnemweb.ucdavis.edu/nemaplex/Plntpara/pltvirus.htm>

VIGNE E., BERGDOL M., GUYADER S. et FUCHS M., 2004. Population structure and genetic variability within isolates of Grapevine fanleaf virus from a naturally infected vineyard in France: evidence for mixed infection and recombination. *Journal of General Virology* (85) : 2435–2445

VIRY M., SERGHINI M. A., HANS F., RITZENHALER C., PINK M. et L., 1993 Biologically active transcripts from cloned eDNA of genomic grapevine fan leaf nepovirus RNAs, *journal of general virology,* 74 : 169-174

VUITTENEZ A., 1958. Activité comparée des fumigants, des insecticides et de divers produits appliqués en traitements du sol sur les contaminations par la dégénérescence infectieuse de la vigne. *Comptes rendus des Séances de l'Académie d'Agriculture de France* 44 : 901-907.

VUITTENEZ A., LEGIN R., KUSZALA J., 1969. Les viroses de la vigne. Les maladies des plantes. Dans : *Acta des journées françaises d'étude et d'information, Paris* 1969 : 57-577.

WALTER B., VUITTENEZ A., KUSZALA J., STOCKY G., BUCKARD J., VAN REGENMORTELM.H.V., 1984. Détection sérologique des virus du court-noué de la vigne par le test ELISA. *Agronomie,* 4 : 527-534.

WALTER B., BOUDON-PADIEU E., RIDE M. Introduction. Généralités sur les virus. Dans : *Maladies à virus, bactéries et phytoplasmes de la vigne. Collection des usuels Féret de la vigne et du vin* 2000 ; p18. Editions Féret.

WALTER B., MARTELLI GP., 1998. Considerations on grapevine selection and certification. *Vitis.* p 37 : 87-90.

WANG X., BOSSELUT N., CASTAGNONE C., VOISIN R., ABAD P., ESMENJAUD D., 2002. PCR multiplex identification of single individuals of the Longidorid nematodes,

Xiphinema index, *Xiphinema diversicaudatum*, *Xiphinema vuittenezi*, *Xiphinema italiae* using specific primers from ribosomal genes. *Phytopathology* (93) : 160-166.

WETZEL T., JARDAK R., MEUNIER L., GHORBEL A., REUSTLE G..M., KRCZAL G., 2001. Simultaneous RT/PCR detection and differentiation of arabis mosaic and grapevine fanleaf nepoviruses in grapevines with a single pair of primers. *Journal of Virological Methods* (101) : 63–69.

WINTERHAGEN P., BRENDDEL G., KRCZAL G., REUSTEL G.M., 2007. Development of an in vitro dual culture system for grapevine and *Xiphinema index* as a tool for virus transmission. Dans : *South Africa Journal of Enology and Viticulture*, (28), n°1.

XU G. et VERMA D.P., 1997. Dynamics of phragmoplastin in living cells during cell plate formation and uncoupling of cell elongation from the plane of cell division. *Plant Cell*. fevrier 1997; 9 (2) : 157–169

Nom – Prénoms : HALGAND François Gaston Pierrick

Titre de la thèse : Le Court noué de la vigne : Etat actuel des connaissances

Résumé de la thèse :

Le court-noué de la vigne est une maladie provoquée par deux virus du genre *Nepovirus*, le GFLV et l'ArMV. Elle s'inscrit dans un grand groupe unissant différents syndromes appelés syndromes de dégénérescence infectieuse et de dépérissement de la vigne. L'importance économique de cette virose est très importante pour la filière viti-vinicole, étant donné sa présence dans le monde entier, ainsi que les pertes de productivité et la baisse de qualité de la récolte qu'elle peut engendrer. Les connaissances sur la biologie de la maladie sont de plus en plus consistantes et la recherche, très active dans ce domaine, a fait de grandes avancées notamment en génétique. En effet, à l'heure actuelle, les seules perspectives de lutte efficaces pour venir compléter la sélection sanitaire des plants de vigne émanent de la transgénèse.

MOTS CLES : Court-noué, dégénérescence infectieuse, GFLV, ArMV, *Nepovirus*, *Xiphinema index*, *Xiphinema diversicaudatum*, sélection sanitaire.

JURY : Mr Y. F. POUCHUS, Professeur de botanique, faculté de pharmacie de Nantes
Mr C. SALENAVE-NAMOND, Professeur de botanique, faculté de pharmacie de Nantes
Mr J. PILARD, Pharmacien

Adresse de l'auteur : HALGAND François
7 rue des hirondelles 85480 BOURNEZEAU