

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département des Sciences Agronomiques

Polycopié de cours

Phytopathologie partie
Virus, viroïdes et
phytoplasmes

Présenté par Mlle ChougarSafia

Destiné aux étudiants de master
Protection des végétaux

Sommaire

Introduction1

Chapitre I : Les virus

1-Définition d'un Virus	2
2-Structure des particules virales	2
2-1-Le génome	3
2-2-La protéine Capside	3
2-3-Morphologie des Virus	4
3-Infection de la cellule et synthèse de protéines virales	4
3-1-Introduction	4
3-2-La réplication virale	5
3-2-1-Différentes étapes de la réplication	6
a-Attachement	6
b-Pénétratio.....	6
c-Décapsidation.....	6
d-Synthèse des composants viraux	7
e-Assemblage et encapsidatio	7
f-Libération des virus.....	7
3-3-La transmission de virus ou voies de dispersion.....	8
3-4-Migration de cellule à cellule (être transmis ou disparaître)	10
3-5-Nomenclature et classification des virus phytopathogène.....	10
3-6-Principaux virus phytopathogènes	11
3-6-1 Le virus de la mosaïque du tabac	11

Chapitre II : Les viroïdes phytopathogènes

1-Définition	12
2-Structure moléculaire.....	12
3-Classification.....	13
4-Réplication	13
5-Transmission	13

6-Principales maladies à viroïde décrites	13
---	----

Chapitre III : Les phytoplasmesphytopathogènes

Introduction	16
1-Structure cellulaire.....	16
2-Symptômes.....	17
3-Réplication	17
4-Transmission.....	17
5-Taxinomie	17
6-Principales maladies dues aux phytoplasmes	17

Chapitre IV : Diagnostic en virologie végétale

1-Comment orienter un diagnostic	19
2-Symptômes observés à l'échelle cellulaire	19
3-Différents diagnostics.....	20
3-1-Diagnostic par voie biologique.....	20
3-2-Diagnostic sérologique	20
4-Les différentes techniques de diagnostic en virologie.....	21
4-1-Test d'immunoprécipitation et d'immunodiffusion.....	21
4-2- Technique d'ELISA (Enzyme LinkedImmunoSorbentEssay)	21
4-3-Western Blot.....	22
4-4-Microscopie électronique.....	22
4-5-Détection des acides nucléiques viraux	23
4-5-1- Tests par hybridation moléculaire	23
4-5-2- PCR (Polymérase Chain Reaction).....	23

Références bibliographiques

Introduction

La phytopathologie est l'étude des maladies des plantes causées par des virus, des bactéries, des phytoplasmes et des champignons. La phytopathologie a des conséquences néfastes sur toutes les cultures et cause de lourdes pertes de qualité et de rendement. Ces pertes peuvent varier de 10 à 50/100 selon les plantes cultivées et les pays, causant d'importantes répercussions sur l'alimentation mondiale.

Depuis des millénaires, lors des débuts de l'agriculture, l'homme a pris conscience des maladies végétales. Mais la phytopathologie n'a émergé qu'au début du XIX^{ème} siècle comme discipline scientifique. Ce sont les épidémies et les grandes découvertes scientifiques qui marquent un tournant décisif dans l'essor de la phytopathologie. En effet, l'apparition de l'épidémie du mildiou en provenance du Mexique, qui sévit sur la pomme de terre en Europe Septentrionale (1845-1848) notamment en Irlande, fait prendre conscience de la gravité des conséquences des maladies des plantes, tant démographiques que géopolitique.

Un phytopathogène est un organisme vivant ou quasi vivant (bactérie, virus, mycète, nématode) susceptible d'infecter les végétaux et d'y déclencher des maladies. Ils appartiennent à l'ensemble des bioagresseurs des cultures à côté des ravageurs et des adventices.

Beaucoup de virus phytopathogènes (phytovirus) ainsi que des phytoplasmes sont transmis de plante à plante par des organismes vecteurs, dont les insectes phytophages.

Un agent phytophage peut provoquer une maladie chez un hôte, il peut s'agir d'un virus, bactérie ou d'un eucaryote. Lors de la contamination, l'agent pathogène se développe aux dépens de l'organisme hôte qui devient alors son milieu biologique.

Chapitre I : Les virus

1-Définition d'un Virus

Les virus sont des nucléoprotéines infectieuses, ils infectent toute forme de vie. Ils sont constitués principalement soit d'ADN ou d'ARN, mais jamais des deux à la fois. Ils causent des maladies insidieuses (pas de symptômes visibles mais présence du virus), généralisées (chez les plantes) et incurables. Le premier virus des végétaux à avoir été découvert est celui de la Mosaïc du tabac.

Un phytovirus ou virus des plantes est un virus s'attaquant aux organismes végétaux. Ils ont la particularité de pénétrer la cellule végétale de leur hôte afin de détourner à leur profit le mécanisme de la cellule et leur permettre de se reproduire. Cette multiplication virale finit par provoquer une modification métabolique et la destruction de la cellule. Les attaques virales se manifestent par des symptômes tels que les mosaïques, les marbrures et les fasciations.

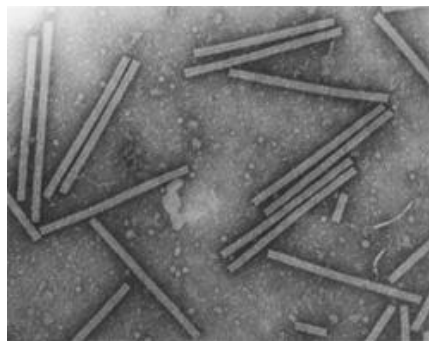


Figure 1 : Virus de la mosaïque du tabac (Beijerinck., 1898).

2-Structure des particules virales

Les particules virales ou virions sont composés d'un acide nucléique, ARN ou ADN (le génome) enveloppé d'une coque protéique : la capsid. La capsid est composée en général d'une seule protéine, qui détermine la forme générale du virion. Les protéines des capsides sont disposées selon deux types d'arrangement :

- Symétrie hélicoïdale qui donne des virions en bâtonnets (bacilliformes) rigides ou flexueux.

- Symétrie icosaèdre qui donne en général des virions de forme para sphérique (surface formée de 20 faces assemblées en triangles équilatéraux et 12 sommets) (fig.02). En effet de nombreux virus forment des particules para sphérique avec activité centrale où se positionne l'acide nucléique.

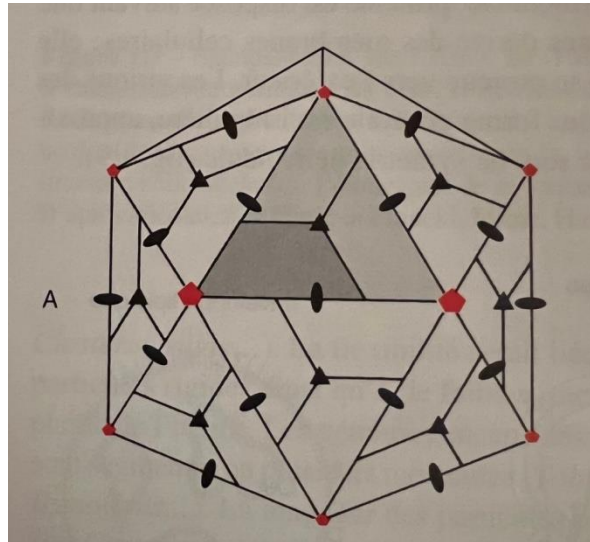


Figure 2 : Unités morphologiques sur les symétries icosaédriques (Rossman et Johnson, 1989).

2-1-Le génome

Le génome représente l'ensemble du matériel génétique d'une espèce, il existe des virus à ARN, qui peuvent être :

- Virus à ARN monocaténaire (simple brin) ou bicaténaire (double brin ou double hélice)
- Virus à ARN monopartite (simple) ou tripartite (complexe)

Ces virus sont dotés d'une vitesse de multiplication appelée polarité, qui peut être positive (agissant comme un messenger) ou négative (transcription en ARN Messenger). Il existe également des virus à ADN monocaténaire non apparié à une autre molécule complémentaire (simple brin) ou bicaténaire (double hélice).

2-2-La protéine capsid

Chez un virus la capsid est la structure qui entoure le génome. Elle est constituée de très nombreuses unités protéiques qui se regroupent pour former des ensembles structurels

identiques appelés capsomères. La capside joue un rôle déterminant, elle assure la protection de l'ADN donc celle du virus aussi. Elle a également des fonctions liées à l'attachement, la pénétration ou la sortie du virus.

2-3-Morphologie des Virus

L'arrangement des sous unités de la capside détermine la morphologie des virus, il existe trois formes de virus :

- Virus ronds ou isométriques ou de symétrie icosaédrique (exemple Cucumbermosaic virus)

- Virus en bâtonnets ou flexueux de symétrie hélicoïdale (comme un ressort), comme le virus de la mosaïque du tabac

- Virus en bacille ou obtus, de symétrie complexe, comme le ANV (virus de la luzerne) ou le TSWV (virus bronzé de la tomate à enveloppe).

3-Infection de la cellule et synthèse de protéines virales

3-1-Introduction

Les plantes opposent à la pénétration des virus une cuticule et une paroi pecto- cellulosique : une feuille de tabac intacte trempée dans une suspension du virus de la mosaïque du tabac (TMV, Tobacco mosaic virus, Tobamo virus) ou dans une suspension d'ARN viral ne s'infecte pas. Pour que l'inoculation réussisse, il faudrait créer des lésions fraîches à la surface la plante.

Donc, la pénétration du virus dans la plante est liée à une effraction.

Ainsi, les virus des végétaux sont donc pour la plupart sélectionnés en permanence dans la nature pour être transmis de plante à plante par un vecteur (puceron, cicadelles « insectes suceurs, famille des hyménoptères », nématodes « vers non segmentés », champignons), qui par des effractions qu'ils provoquent au niveau des tissus de la plante assure la pénétration du virus. Ils peuvent être transmis également par inoculation mécanique, ou par voie végétative (boutures, tubercules...) ou via le pollen ou la semence.

Important : les virus à ARN présentent des taux de mutation très élevés contrairement aux virus à ADN. La réplication est sensible aux erreurs et ces virus ne possèdent pas des **ADN Polymérase** (complexe enzymatique intervenant dans la réplication, préparation, recombinaison de l'ADN) permettant de détecter et de corriger ces erreurs.

3-2-La réplication virale

La réplication virale est l'ensemble des processus biochimique qui se déroulent dans la cellule infectée par un virus, et qui ont pour effet de produire de nouvelles unités de ce virus ou virion. La multiplication virale est un phénomène complexe au cours duquel le virus va détourner la machinerie cellulaire à son profit. Du fait de leur simplicité extrême, les virus ne peuvent pas se multiplier eux même. Cette multiplication consiste en l'introduction du génome viral dans une cellule, et c'est elle qui va fabriquer de nouveaux virus selon un procédé de biosynthèse que l'on appelle réplication.

Il y'a deux modes de réplication :

Réplication des virus à ARN, c'est le processus par lequel les nouvelles copies d'ARN génomiques sont reproduites. La réplication de l'ARN a lieu dans le cytoplasme et elle est réalisée par l'ARN Polymérase virale.

La réplication virale comprend plusieurs étapes :

- Pénétration dans la cellule hôte
- Décapsidation
- Réplication du génome
- Synthèse des composants viraux
- Assemblage et encapsidation
- Libération.

Le temps du cycle viral peut varier d'un virus à un autre en fonction de la taille du génome et de la complexité du cycle viral (04 à 08 heures pour les Poliovirus, plus de 40 heures pour les Herpesviridae).

3-2-1-Différentes étapes de la réplication

a-Attachement

La première étape est l'entrée en contact du virus et de la cellule. C'est de l'attachement de la surface virale sur la surface cellulaire. Cet attachement se fait par une structure de la capsid sur des virus nus, par des glycoprotéines enveloppe sur les virus enveloppés. Ces protéines ou glycoprotéines s'attachent sur des récepteurs situés sur la membrane cytoplasmique de la cellule hôte.

b-Pénétration

Les plantes sont physiquement protégées de la pénétration des virus par la cuticule qui les recouvre mais aussi par la paroi pectocellulosique qui entoure chaque cellule. Les virus utilisent des points d'entrées accidentels qui permettent de se débarrasser de ces barrières. Afin de permettre à l'infection de se développer dans la plante, les virus doivent atteindre des zones éloignées du point d'inoculation et doivent se déplacer tout au long de celle-ci.

On observe deux types de mouvements :

- A courte distance qui permet au virus de passer de cellule en cellule via le plasmodesme.
- A longue distance lors duquel les virus utilisent la sève élaborée des vaisseaux conducteurs de leur hôte pour envahir la plante entière.

Le sens de déplacement des virus est toujours celui des carbohydrate circulant dans la plante, c'est-à-dire des tissus matures vers les tissus jeunes.

c-Décapsidation

Au cours de la pénétration du génome viral dans la cellule, celle-ci est partiellement ou totalement débarrassée des protéines qui le protégeaient dans le virus, ce processus est appelée décapsidation. Cette dernière aboutit à la libération du génome viral dans la cellule cible.

Les virus nus (non enveloppés) injectent leur génome dans le cytoplasme de la cellule. Cette étape peut se faire au niveau de la membrane plasmique, suite à l'interaction de la capsid avec le récepteur. Elle peut aussi s'opérer après endocytose. Le génome est alors injecté à travers les parois de l'endosome.

Dans le cas des virus enveloppés, l'entrée de leur génome dans le cytoplasme de la cellule hôte fait intervenir une étape de fusion de deux membranes : La membrane virale et celle de la cellule hôte. Cette fusion est assurée par certaines glycoprotéines de l'enveloppe du virus.

d-Synthèse des composants viraux

Grâce à la génération des copies abondantes de son génome et sa décapsidation en ces copies, le virus continue à infecter de nouveaux hôtes. La réplication des virus au sein des cellules est très variée, elle dépend du type de gènes viraux impliqués. La plupart des virus à ADN s'assemblent dans le noyau, tandis que la plupart des virus à ARN se développent uniquement dans le cytoplasme.

Les organites existants dans la cellule hôte fabriquent les composants suivants :

- Les protéines virales : L'ARN messager du virus est traduit au niveau des ribosomes des cellules en deux types de protéines virales, structurelles et non structurelles.
- L'acide nucléique viral (correspondant à la réplication du génome) est synthétisé.

e-Assemblage et encapsidation

Les virions sont assemblés et maturés pour former de cellules infectées. Il y'a encapsidation du génome avec les protéines virales pour former de nouvelles particules virales. Cela peut se produire dans le noyau de la cellule, le cytoplasme ou la membrane plasmique pour la plupart des virus enveloppés. Les virus enveloppés acquièrent leur enveloppe par bourgeonnement au détriment de la membrane plasmique hôte ou de la membrane nucléaire de la cellule.

f-Libération des virus

Les virus reconstitués (nouvellement formés) sont libérés à l'extérieur de la cellule. Cela se produit par rupture soudaine de la cellule, par bourgeonnement de virus à travers la membrane cellulaire. Les nouveaux virus peuvent alors envahir ou attaquer d'autres cellules ou rester dormants dans les cellules hôtes originelles.

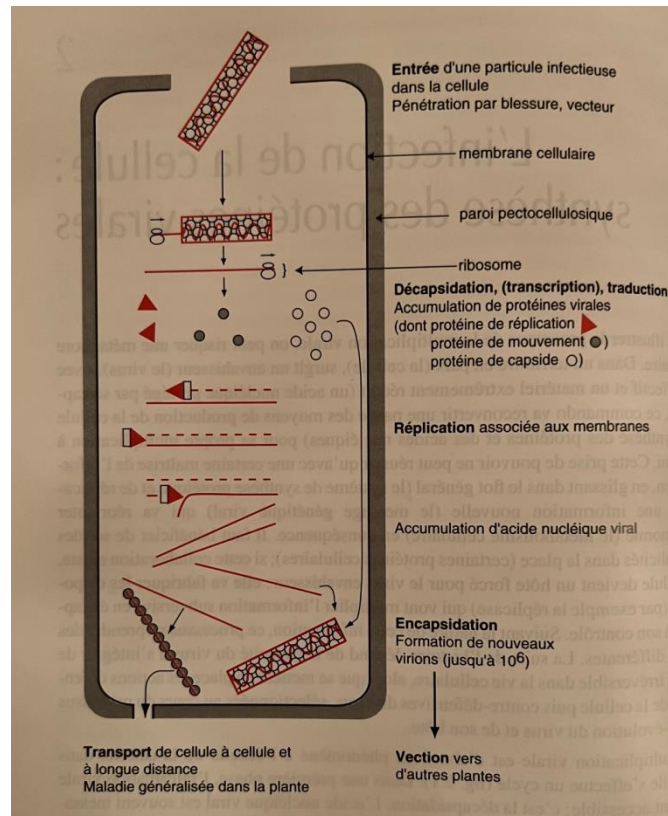


Figure 3 : Cycle du virus dans la cellule (Astier et *al.*, 2001).

3-3-La transmission de virus ou voies de dispersion

La transmission des phytovirus est un processus biologique nécessaire à la survie des virus des végétaux. Ceux-ci, comme tous les virus sont des parasites intracellulaire, qui pour survivre doivent se reproduire et infecter les cellules végétales vivantes.

Le virus a deux voies de dispersion :

- 1- **Voie avec vecteur ou horizontale ou externe** avec relation biologique avec le vecteur : (insectes, acariens, nématodes parasites). Elle implique entre chaque couple-vecteur des interactions moléculaires très spécifiques. Cela explique, pourquoi en général, un virus donné ne sera transmis que par une espèce vectrice ou par un ensemble d'espèce taxonomiquement proche. De même, le plus souvent, l'ensemble des virus d'un genre (les Potyvirus, par exemple) sera transmis par le même type de vecteur (les pucerons en l'occurrence).
- 2- **Voie sans vecteur vertical (ou interne)** : permet au virus de se perpétuer dans les tissus vivants de la plante infectée en contaminant les organes de multiplication. C'est une voie

permettant donc au virus de se perpétuer de génération en génération, mais ne lui permet pas d'infecter d'autres individus de la même génération. Ce mode de transmission du virus contribue à disséminer des virus sur l'ensemble de la planète à travers les échanges commerciaux internationaux.

D'où : Organisme de quarantaine : Tolérance zéro, n'accepte aucun seuil de tolérance.

Organisme nuisible : accepte un certain seuil de tolérance.

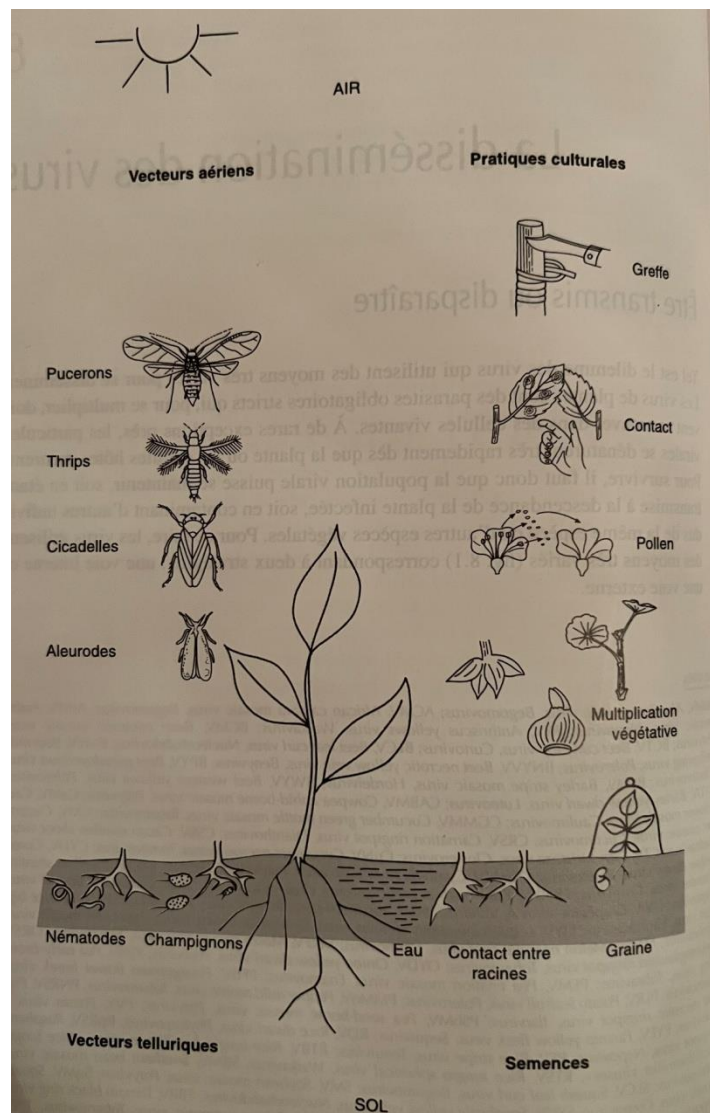


Figure 4 : Diversité des modes de dissémination des virus des plantes (Astier et *al.*, 2001).

3-4-Migration de cellule à cellule (être transmis ou disparaître)

Il y'a deux sorte de migrations :

- 1- Migration de courte distance, d'une cellule à une autre, grâce à des protéines de mouvements à travers le plasmodesme (courte distance).
- 2- Il y'a des mouvements de virus dans la plante (longue distance), 03 jours dans une feuille, 04 jours mouvement descendant vers la racine, 05 jours mouvement ascendant vers les feuilles. Dans cas, le virus va suivre le mouvement dans la sève brute (provenant des racines qui contient uniquement l'eau et les sels minéraux) et la sève élaborée (constituée d'eau et de matières organiques, lipides, protides, glucides).

3-5-Nomenclature et classification des virus phytopathogènes

Les virus sont classés selon la nature de leur génome. D'abord virus à ARN simple (brin ou monocaténaire) de polarité positive, puis négative. Ensuite, les virus ARN double brin

Il est important de signaler que la classification des virus n'est pas intégrée à celle réalisée pour les êtres vivants. L'appartenance même des virus au monde vivant étant sujette à débat.

Cependant la taxinomie des virus est similaire à celles des organismes cellulaires :

Ordre : (suffixe : Viral)

Famille : (suffixe : Viridae)

Sous-Famille : (suffixe : Virinae)

Genre : (suffixe : Virus)

Espèce

La taxinomie des virus phytopathogènes est fondée sur les critères de différenciation taxinomiques essentiels, qui sont la présence ou l'absence d'une enveloppe virale, la symétrie de la capsid et la nature du génome.

L'acide nucléique qui constitue le génome présent dans le virion peut être constitué d'ARN, ou d'ADN, dont la forme peut être linéaire ou circulaire, segmentée ou non segmentée. La structure de l'acide nucléique peut être monocaténaire (à simple brin, ss) ou bicaténaire (à double brin, ds).

3-6-Principaux virus phytopathogènes

Le virus de la mosaïque du tabac (TMV) et le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) sont fréquemment utilisés en biologie moléculaire des plantes.

3-6-1 Le virus de la mosaïque du tabac

Premier virus à avoir été découvert à la fin du XIX^{ème} siècle, le virus de la mosaïque du tabac (TMV, *Tobacco mosaic virus*) est une espèce de virus du genre Tobamovirus (famille des virgaviridae), dont il est l'espèce type. C'est un virus à ARN simple brin, de sens positif. Ce phytovirus à répartition cosmopolite, infecte de nombreuses espèces de plantes, en particulier le tabac commun (*Nicotiana tabacum*) ainsi que d'autres solanacées (poivron, tomate, aubergine), chez lesquels, il provoque entre autre des symptômes de décoloration des feuilles sous formes de mosaïques ou de marbrures. Les folioles s'enroulent prenant un aspect filiforme brûlé, se rabougrissent et finissent par se nécroser.

Le virion du TMV est une particule cylindrique, en forme de bâtonnet à symétrie hélicoïdale, de 300 nm de long et 18 nm de diamètre (Fig.05). La capsid est formée de 2300 protéines de capsid (capsomères). Chaque capsomère étant formé d'un seul type de protéine, constitué de 158 acides aminés.

L'ARN monocaténaire est enroulé en hélice à l'intérieur de cette capsid, laissant un canal central vide de 04 nm de diamètre, visible au microscope électronique. Ce virus peut résister à des températures de 90°C pendant 10 minutes.

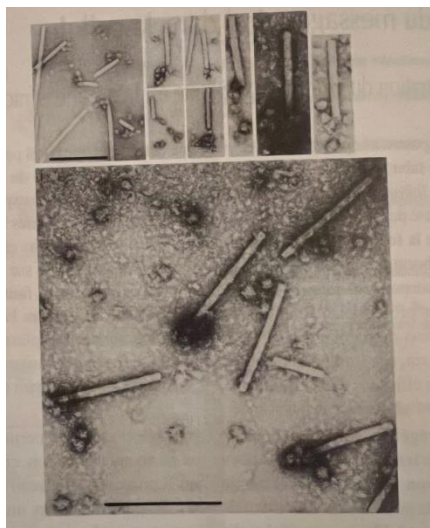


Figure 5 : Particules de TMV partiellement décapsidées in vitro (Wilson, 1984).

Chapitre II : Les viroïdes phytopathogènes

1-Définition

Particule virale simple, un viroïde est composé d'un seul ARN circulaire sans capsid. Sa séquence n'encode aucune protéine. Il est plus petit que les virus (environ 50 *nm* de long). Les viroïdes ont été découverts en 1971 par Théodore Otto Diener, spécialiste des maladies végétales en cherchant l'agent causal de la maladie des tubercules fusiformes de la pomme de terre.

2-Structure moléculaire

Les viroïdes infectent l'intérieur des cellules en tant que particules d'ARN uniquement sans capsid, ni enveloppe. Ils n'ont qu'un seul ARN circulaire qui contient très peu de nucléotides (250 à 400) (Fig.06). Leur génome s'organise en bâtonnet et ne code aucune protéine. Contrairement au virus dont l'ARN peut être copié dans le cytoplasme ou le noyau, l'ARN des viroïdes est copié dans le noyau ou chloroplaste selon sa famille. Cette réplication se fait grâce aux enzymes de la cellule hôte, comme les ARN Polymérase.

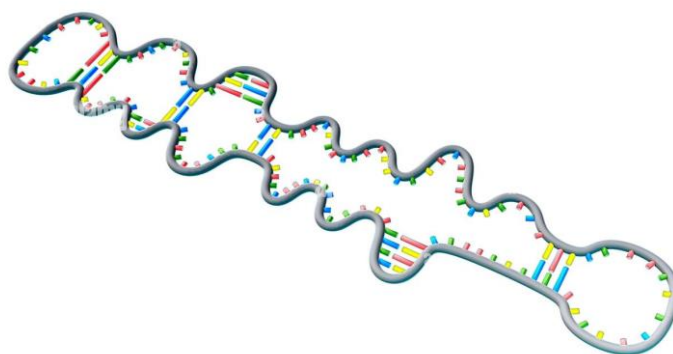


Figure 6 : Structure d'un viroïde (Oto, 2017).

3-Classification

Sont reconnus une trentaine d'espèces viroïdes qui se répartissent en deux familles :

-Famille des Pospiviroïdae qui regroupe 05 genres et 27 espèces au total.

-Famille des Avsunviroïdae qui regroupe 03 genres et 04 espèces de viroïdes à répllication chloroplastique.

4-Réplication

La répllication du génome des viroïdes se déroule dans les chloroplastes dans le noyau. Les enzymes qui participent à la répllication sont l'ARN Polymérase « ADN dépendante » pour les viroïdes à localisation nucléaire et l'ARN Polymérase NEP (nuclear-encoded, but chloroplastlocalised DNA-dépendent ARN Polymérase) pour les viroïdes localisés dans les chloroplastes.

La répllication se fait par un mécanisme de « cercle roulant » symétrique ou asymétrique. Elle serait favorisée par la lumière et températures. Ce qui expliquerait en partie qu'ils soient impliqués dans des pathogènes affectant les plantes tropicales méditerranéennes ou cultivées sous serres. Les symptômes sont d'autant plus graves quand il fait sec et/ou chaud.

5-Transmission

En général les viroïdes ne sont pas transmis par les insectes vecteurs. La paroi cellulaire de l'épiderme végétal est infectée suite à un dommage mécanique (causé par le vent, les animaux, les outils ou machines agricoles, etc...). L'infection peut parfois se transmettre par les graines ou le pollen.

L'infection d'un végétal se déroule en plusieurs étapes :

-Déplacement vers le site de répllication (noyau, chloroplaste).

-Contamination des cellules voisines jusqu'à infection de toute la plante.

Lorsqu'une plante est infectée par un viroïde, la plupart des symptômes se manifestent au niveau des tissus et des organes. Le feuillage et les tiges peuvent être déformés, décolorés ou abimés. Les fleurs sont nécrosées, petites, dépigmentées. La taille, la forme et la qualité des fruits sont également affectées.

6-Principales maladies à viroïde décrites

Les viroïdes attaquent essentiellement des plantes économiquement importantes, comme la pomme de terre, le concombre, la tomate, la vigne et les arbres fruitiers. L'infection des

végétaux cultivés peut se révéler extrêmement dommageables. Les conséquences allant de la perte du rendement jusqu'à la mort de la plante.

Tous les viroïdes ne sont pas pathogènes, certains sont asymptomatiques, c'est le cas du viroïde du houblon. D'autres sont bénéfiques pour leur hôte, cas exemple, la production de citronniers nains après l'infection par des viroïdes asymptomatiques mise au point en Australie, afin de permettre une augmentation de la densité plantée pour une meilleure récolte. Parmi les principales maladies à viroïdes décrites :

-L'exocortis des agrumes (*Citrus exocortisviroïd*, Cevd)

-*Coconutcadangcadandviroïd* (CCCVd) et *Coconuttinangajaviroïd* (CTiVd) qui affectent les palmiers (*Elaeis guineensis*) et cocotiers (*Coryphaelata*).

-Le viroïde de la filosite du tubercule de la pomme de terre (PSTVd) est un agent infectieux qui cause la maladie de la filosite des tubercules de la pomme de terre et la maladie du sommet touffu de la tomate. Cette infection entraine une perte de rendement et une dégradation de la qualité de la récolte.

Ses principaux symptômes apparaissent en entrainant une formation de petits tubercules fusiformes ornés de nombreux yeux proéminents qui entraine un faible rendement. Les tubercules peuvent afficher une peau anormale et souvent, ils se fendent au cours de leur développement. Le feuillage des plants infectés peuvent être dressé et rabougri avec des petites folioles rugueuses.

Chez la tomate, les plants infectés ont une croissance rabougrie caractéristiques, quant aux feuilles, elles peuvent être tachetées, rugueuses, jaunies et recourbées vers le bas. Le rendement des plants infectés peut être réduit, les fruits pouvant avorter ou rester durs et verts.



Figure 7 : L'exocortis des agrumes (*Citrus exocortisviroïd*, Cevd) (Vernière et *al.*, 2006).

Chapitre III : Les phytoplasmes phytopathogènes

Introduction

Les phytoplasmes ont été découverts par Doi *et al.* (1967), qui cherchaient l'agent causal du jaunissement des asters. Ces organismes unicellulaires sont désignés par l'expression « organisme type mycoplasme » ou MLO (abréviation du *mycoplasme-like organisms*) en raison de leur ressemblance morphologique avec les mycoplasmes affectant les animaux et leur sensibilité aux antibiotiques de la famille des tétracyclines. Ils appartiennent à la classe des mollicutes.

1-Structure cellulaire

Les phytoplasmes sont des pathogènes procaryotes dépourvus de paroi cellulaire de type pléomorphique (capacité de revêtir des formes différentes dans certaines conditions ou sous des influences déterminées). Leur diamètre mesure entre 0.2 à 0.5 μm , ce sont des parasites obligatoires des végétaux qui vivent dans les cellules ciblées du phloème des plantes hôtes (Fig.08). Plusieurs fonctions biosynthétique leurs font défaut.

Les phytoplasmes sont des microorganismes bactériens, à mobilité mal précisée, parasite obligatoire biotrophe (se nourrissant aux dépens d'un autre organisme). Ils vivent dans les tissus conducteurs de la sève élaborée (vaisseaux des phloèmes). L'observation au microscope électronique montrent qu'ils sont plutôt sphériques, parfois polymorphe. Ils sont donc plus petits que les bactéries les plus courantes et ne sont pas cultivable *in vitro*.

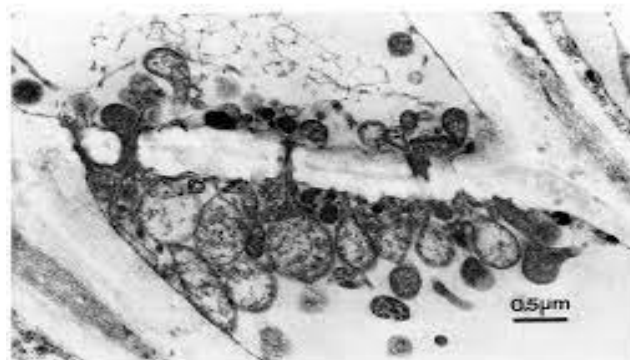


Figure 8: Un phytoplasme franchissant la paroi d'un tube criblé du phloème (Cousin., 1995).

2-Symptômes

Les principaux symptômes caractéristiques des infections par les phytoplasmes :

- Virescence (les fleurs perdent leur pigmentation normale et deviennent vertes)
- Phyllodie (les parties florales développent des structures foliaires)
- Syndrome de balai de sorcière (prolifération de rameaux axillaire)
- Prolifération anormales des parties aériennes et des racines, jaunissement, rougissement ou autres décoloration des feuilles.
- Diminution de la taille des feuilles, nécrose du phloème et dépérissement.

3-Réplication

La réplication chez les phytoplasmes se fait par simple division cellulaire aboutissant à la formation de deux bactéries filles (reproduction végétative par scissiparité). Ce mode de multiplication très rapide (temps de génération variant d'une vingtaine de minutes à quelques heures) permet aux populations bactériennes d'évoluer exponentiellement si les conditions leurs sont favorables.

4-Transmission

Les phytoplasmes sont transmis par les insectes vecteurs, le plus souvent des cicadelles et psyllidés qui se nourrissent du phloème et transmettent le pathogène sur un mode persistance. La croissance se fait dans les glandes salivaires, le tractus intestinal et l'hémolymphe intracellulairement. Le temps de latence avant la transmission varie de 10 à 14 jours suivant la température.

Les phytoplasmes peuvent être également transmis par des cuscutes et des greffons, se transmettent par propagation végétatives à partir des parties infectées d'une plante.

5-Taxinomie

Les phytoplasmes appartiennent à l'ordre des monophylétiques des Acholeplasmatales.

6-Principales maladies dues aux phytoplasmes

On évalue à un millier le nombre d'espèces végétales touchées par les phytoplasmes. La plupart des plantes hôtes des phytoplasmes sont dicotylédones. On observe moins fréquemment des phytoplasmes sur des plantes monocotylédones.

Les phytoplasmes sont à l'origine de nombreuses maladies bactériennes des plantes, telles que :

- La phyllodie
- Flavescence dorée
- Jaunisse du liseron
- Flétrissement violacée de la pomme de terre
- Jaunisse du liseron
- Dépérissement du poirier (Fig.09)
- Nanisme jaune du riz (Fig.10)



Figure 9 : Feu bactérien du poirier (FiBL et Häseli., 2016).



Figure 10 : Nanisme jaune du riz (Weller., 2006).

Chapitre IV : Diagnostic en virologie végétale

1-Comment orienter un diagnostic

Savoir établir un diagnostic, c'est savoir détecter avec précision le ou les virus qui en sont la cause, est un préalable indispensable à la plupart des études de virologie végétale. Le diagnostic présente deux composantes complémentaires.

1-Symptômes observés sur la plante Les virus des plantes provoquent sur tout ou une partie du végétal des modifications caractéristiques. Elles se traduisent par :

- Des anomalies de pigmentation, des mosaïques (répartition anormales des pigments chlorophylliens dans les feuilles).

- Des panaches florales (absence de pigments anthocyaniques vacuolaires dans les pétales, ou striés dues à l'accumulation de ces pigments).

- Nécroses (la mort des cellules infectées entraînent sur les feuilles une coloration brune).

- Retard de croissance et déformation (dû à la multiplication du virus entraînant une baisse de vigueur sur la plante).

Des conditions environnementales joueraient un rôle prépondérant dans l'intensité et le développement des symptômes (température, éclairage, nutrition).

Important : toutefois, une difficulté est rencontrée dans la symptomatologie des virus, c'est la confusion possible avec d'autres causes pathologiques ou physiologiques (c'est-à-dire, des virus différents peuvent provoquer chez le même hôte des symptômes similaires rendant toute distinction impossible).

2-Symptômes observés à l'échelle cellulaire

Outre l'analyse des symptômes macroscopiques, on peut chercher à observer les symptômes induit à l'échelle cellulaire (présence d'inclusions spécifiques d'un genre donné, « corps striés au niveau du phloème », « agrégats viraux au niveau de l'épiderme »...) après coloration (Fig.11).

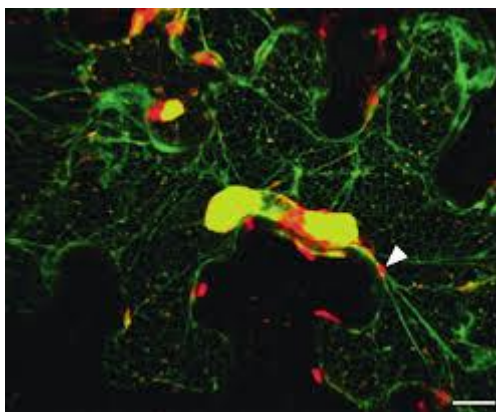


Figure11 : Remodelage cellulaire par les phytovirus (Grangeon et Laliberté., 2013).

3-Différents diagnostics

3-1-Diagnostic par voie biologique

Plusieurs diagnostics sont menés par voie biologique :

- Etude des symptômes au champ pour orienter le diagnostic, étude des symptômes extériorisés après transmission expérimentale.
- Inoculation mécanique permet l'identification du virus, séparation des complexes et isolement, dosage biologique et mise en culture.
- Le greffage sur des variétés indicatrices est un type d'indexage biologique (surtout pour les espèces fruitières et vigne).

3-2-Diagnostic sérologique

Il est à connaître un principe de base : tout virus introduit dans le corps d'un animal, induit la formation d'un anticorps spécifique. Ces anticorps ont la capacité de se lier *in vitro* (test sérologique) à l'antigène ayant induit leur formation.

La production d'anticorps se fait de la manière qui suit : La purification du virus se fait selon plusieurs méthodes dépendantes du virus, son but est de séparer les nucléoprotéines virales des composantes de la plante hôte sans lui faire perdre son pouvoir infecté.

-Etape de la purification : extraction → filtration → clarification (centrifugation, solvant, chaleur) → concentration (ultracentrifugation) → virus purifié.

-Immunisation des animaux : on effectue des injections sous cutanées intraveineuses de virus ± adjuvant, à intervalle régulier, puis dosages des anticorps produits, s'ensuivra l'abattage des animaux et récupération du sang et du sérum. Ainsi obtenu, il sera conservé et utilisé dans les tests, pour produire un sérum polyclonal.

Des tests plus pointilleux seront présentés dans le cours qui suivra.

4-Les différentes techniques de diagnostic en virologie

Beaucoup de méthodes et de techniques différentes sont utilisées pour la détection et l'identification des phytovirus. Les méthodes sérologiques sont basées sur les réactions immunitaires d'un virus (antigène) avec les anticorps spécifiques.

4-1-Test d'immunoprécipitation et d'immunodiffusion

Premier test virologique utilisé en virologie végétale, c'est une méthode rapide et peu sensible qui a été utilisée pour la détection de certains virus de la pomme de terre et des plantes à bulbe vers 1950. Lorsqu'on mélange un extrait de feuilles infectées à un antiserum spécifique, il y'a formation d'énormes agrégats virus, anticorps insoluble.

Cette réaction d'immunoprécipitation ne se produit que lorsque les concentrations relatives du virus et des anticorps sont comprises dans une gamme dite d'équivalence.

Dans un test de micro précipitation sur lame dans un milieu liquide, il y'a formation d'un flocculat. S'il y'a excès d'antigènes ou d'anticorps, le précipité ne sera pas visible.

La technique de dosage d'immunoprécipitation par enzyme liée, a pour principe détecter ou doser la présence de protéines d'anticorps, d'un antigène dans un échantillon.

4-2- Technique d'ELISA (Enzyme LinkedImmunoSorbentEssay)

Le marquage des anticorps par une enzyme augmente la sensibilité de la détection. Le principe de cette technique consiste non pas à observer directement le précipité antigène-

anticorps, mais à relever cette interaction grâce au marquage des immunoglobulines à l'aide d'enzymes gouvernant une réaction colorée.

Le test ELISA comporte plusieurs étapes successives :

- Une plaque contenant 96 alvéoles puits sert de support à l'analyse. Au fond de chaque puits se trouve l'antigène (morceau de virus dont on cherche à identifier la présence).

- Du sang est collecté, c'est la centrifugation d'où l'obtention d'un sérum avec anticorps.

Quelques gouttes de sérum sont placées dans un puits. Si le patient est contaminé par le virus testé, son sang contient des anticorps spécifiquement dirigés contre lui. Dans ce cas, il se fixe aux antigènes.

- Les puits sont vidés et rincés pour éliminer les anticorps qui ne sont pas fixés aux antigènes.

- On verse alors un autre anticorps dont le rôle est de détecter l'anticorps potentiellement fixé à l'antigène, puis de s'y fixer. Cet anticorps de détection est associé à une enzyme : la peroxydase.

- Ajout d'un liquide, celui-ci contient un produit sur lequel va agir la peroxydase en la colorant. Ainsi s'il y'a coloration, il y'a contamination.

4-3-Western Blot

Egalement appelée transfert de protéines, c'est une méthode de biologie moléculaire permettant de détecter et d'identifier les protéines spécifiques dans un échantillon biologique à l'aide d'anticorps dirigés contre ces les protéines préalablement dénaturées selon leur taille. Les protéines sont transférées du gel sur une membrane (nitrocellulose).

Il est à rappeler que l'électrophorèse est une migration de particules chargées électriquement sous l'effet d'un champ électrique.

4-4-Microscopie électronique

La microscopie électronique est le seul outil permettant de déterminer la taille et la forme des virus ainsi que les différentes modifications cytologiques. L'association de la sérologie et de

la microscopie électronique représente les techniques d'immuno-Electromicroscopie (IEM), qui combinent l'observation des particules virales et la visualisation de la réaction antigèneanticorps. Elles constituent l'un des moyens les plus précis permettant l'identification d'un virus.

4-5-Détection des acides nucléiques viraux

On constate avec les techniques sérologiques qui détectent en général une protéine virale, la protéine capsidique. Les techniques basées sur la séquence des acides nucléiques permettent de détecter n'importe quelle région du génome viral. Deux techniques ouvrent de nouvelles perspectives pour le diagnostic.

-L'hybridation moléculaire.

-Amplification des séquences (Polymerase Chain Reaction ou PCR).

4-5-1- Tests par hybridation moléculaire

Le test par hybridation moléculaire est basé sur la formation d'une molécule d'acide nucléique double brin (hybride) obtenue par hybridation entre une molécule cible représentée par un fragment de la séquence du génome viral et la sonde constituée par un acide nucléique complémentaire (ADNc ou ARNc) de cette séquence. La révélation de cette hybridation est assurée grâce au marquage de la sonde par un isotope radioactif ou marqueur froid comme la biotine.

Un **Isotope** est un nucléide partageant le même nombre de protons, mais le nombre de neutrons est différent.

4-5-2- PCR (Polymérase Chain Reaction)

Le principe de la PCR repose sur la capacité de synthèse d'un fragment d'ADN par une enzyme de réplication (l'ADN polymérase) en utilisant comme amorce de courtes séquences nucléotidiques.

La PCR a lieu dans un micro-tube ou microplaque dans lesquels est placé l'ensemble des réactifs nécessaires. Le protocole comprend 03 phases successives.

- Etape de dénaturation de 15 secondes à 02 minutes à 95°C, qui permet une séparation des chaînes complémentaires double brin de l'ADN.

- Etape d'hybridation de 1 à 2 minutes, entre 37 et 60°C. Les amorces s'apparient sur leurs séquences complémentaires.

- Etape d'extension de 30 secondes à 25 minutes à 72°C qui conduit à la synthèse d'une séquence complémentaire du brin matrice en présence de l'enzyme polymérase et de nucléotides précurseurs.

Références Bibliographiques

Astier A., Alboury J., Maury Y. et Lecoq H., 2001. Principes de virologie générale. Génome, pouvoir pathogène, écologie des virus. Edition, INRA, Paris. 444p.

Biachessi S., Chevalier C, Galloux M., Langevin C., Legoffic R. et Brenon T.M., 2017. Les virus ennemis ou alliés. Edition, Quae, Paris. 110p.

Chapuis S., 2014. Contribution à l'étude de deux mouvements systémiques de deux phytovirus : Analyse comparative de transcriptome de cellules compagnes infectées et saines. Thèse de Doctorat en aspects moléculaires et cellulaire de la biologie. Université de Strasbourg. 315 p.

CIPV., 2016. PD 12 : Phytoplasmes. Normes internationales pour les mesures phytosanitaires 27. Convention Internationale pour la Protection des Végétaux. 16p.

Cornuet P., 1987. Eléments de virologie. Edition, INRA, Paris. 206p.

Davis R.E. et Sinclair W.A., 1998. Phytoma identity and disease etiology. *Phytopathology.*, **88**, 1372-1376.

Diene T.O., 1991. Subviral pathogens of plants : viroids and viroidlike satellite. *Faseb J.*, **5**, 28.08-13.

Doi Y.M., Teranaka M., Yora K. et Zhaoy Y., 1967. Mycoplasma of PLT-group like microorganisms found in the phloem of plant infected with mulberry dwarf *Prunusssp*, multicolus

characterization based on 16S r-RNA, sec y, and ribosomal protein gene. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, **63**, 766- 776.

Ishii T., Yora Y. et Asuyama H., 1967. Suppressive effects of antibiotics of the tetracycline group on symptom development in mulberry dwarf disease. *Annal Journal of Phytopathological Society of Japon.*, **33**, 267-275.

Lecoq H., 2020. Les virus des plantes, de redoutables ennemis de culture qui sont bien difficiles à combattre. Inra, France. 5p.

Lee I.M., Davis R.E. et Gundersen-Rindal D.E., 2000. Phytoplasma : phytopathogen molecules. *Annual Review of Microbiology.*, vol**54**, 221-225.

Louis T., 2020. La folle histoire des virus. Edition, Humensciences, Paris. 353p.

Maurel M.C., 2018. A la frontière du vivant : les viroïdes. Museum National d'histoires naturelles (MNHN). Sorbonne Université.

Oshima k., Maeyima K. et Namba S., 2013. Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology* doi : 10.3389/fmicb.2013.00230.

- Rossmann M.G. et Johnson J.E., 1989.** Isocahedral RNA virus structure. *Ann. Rev. Biochem.*, **58**, 533-573.
- Semüller E., Garnier M. et Schneider B., 2002.** Mycoplasma of plants and insects. In s. Razin. Molecular and biology and pathogenic of mycoplasmas. 9-115. New York, Kluwer Academic Publishers/ Plenum publishers. 572p.
- Sutic D.D., Ford R.E et Tosic M.T., 1999.** Handbook of plant virus diseases. CRC Press, Paris. 584p.
- Turgeon R., 1989.** The sink source transition in leaves. *Annu Rev Plant Physiol.*, **40**, 119-38.
- UCLouvain., 2020.** Initiation à la virologie. Faculté d'Ingénierie Biologique agronomique et Environnementale.
- UCLouvain., 2021.** Virus de la mosaïque du tabac Tobacco mosaic virus. Université Catholique de Louvain.
- Uyeda I. et Chirada M., 2016.** Plant virology protocols. New approaches to detect virus and host responses. Edition, Humana Press. Methods in molecular Biology series., Vol. 1236. 292p.
- Wilson T.M.A., 1984.** Ca-translational disassembly of tobacco mosaic virus *in vitro*. *Virology*, **137**, 255-26
- Wingmann E., Ueki S., Trutnyeva K et Citovsky V., 2004.** The ins and outs of non-destructive cell-to-cell and systemic movement of plant viruses. *Critical Reviews in Plant Science.*, **23**, 195-250.