

UNIVERSITÉ DE BLIDA 1

Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Département de Biotechnologies

MÉMOIRE DE MASTER

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Système de production Agro-écologique

EFFET DES ÉLÉMENTS MINÉRAUX SUR LE DÉVELOPPEMENT ET L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE *Verticillium dahliae*.

Par

AIT YOUSSEF Sarah

Devant le jury composé de :

KEBOUR D.	Professeur	UB1	Présidente
BENKORTBY	M.A.B	UB1	Examinatrice
BOUCHENAK F.	M.C.B	UB1	Promotrice
DEGAICHIA H.	Doctorant	UB1	Co-promoteur

Blida, Septembre 2019

DEDICACE

Je dédie ce travail a ceux dont le soutien a permis à ce document de voir le jour, a celle qui a fait de moi une femme et qui m'a transmis les valeurs humaines... au pilier de la famille ... le symbole de la tolérance, de la bonté et de la patience.. Ma mère. A mes deux amours mon petit frère et ma sœur ainée, Ait youcef Abdessetar et Ait youcef Faiza.

Je dedie ce travail a mon amie de longue date Djgaguen amina qui n'a ménagé aucun effort avec ses soutiens aux moments les plus difficiles, conseils, encouragements et confiance placée en moi.

Je dédie aussi ce travail a mes proches, a mon grand-père Chiahi mokhtar ainsi qu'a ma tante Chiahi wafia, a mes amis Belreka abderrezak, et Bettaher naima ainsi qu'a toute personne qui m'est chère.

REMERCIEMENTS

J'ai le plaisir d'exprimer ma profonde gratitude à Mme Bouchnak F. et Mr Degaichia H. pour avoir accepté la direction de mes travaux lors de cette recherche, pour leurs précieux conseils, leurs aide, et le soutien dont ils ont fait preuve a mon égard tout au long de ce travail.

Mes vifs remerciements vont également au membre du jury, la présidente Mme KEBOUR D. et l'examinatrice Mme BENKORTBY. Pour l'intérêt qu'elles ont porté a ce modeste travail.

Je tiens tout particulièrement a remercier une personne qui m'est très cher.. Mon camarade et mon ami Chadi abdeslam. Pour son aide inestimable a la réalisation de ce travail, son dévouement, ses encouragements et plus.

Je remercie tous mes camarades, plus particulièrement ISMAILI hanane , OTMANE TELBA fateh, et DJOUDAR mouhamed, pour le soutien qu'ils m'ont apporté durant tout mon cursus universitaire.

Mes sincères remerciements vont à toutes les personnes du département d'agronomie, les ingénieurs de laboratoires, ainsi qu'à l'ensemble des professeurs qui m'ont beaucoup appris en particulier le Professeur Benrebiha F.Z.

ABSTRACT

EFFECTS OF MINERAL ELEMENTS ON THE DEVELOPMENT AND ENZYMATIC ACTIVITY OF *Verticillium dahliae*

The objective of this study is to examine in vitro the effect of nitrogen, potassium and magnesium at different concentrations on mycelial weight growth and cellulose activity of *verticillium dahliae*. The different sources of mineral elements are separately incorporated at increasing concentration on Czapek-dox liquid culture medium for 2 weeks of incubation at 25°C and in the dark. Ammonium chloride (NH₄Cl) significantly reduces weight gain after 2 weeks of incubation of the fungus but acts differently on its enzymatic activity. In the control, we observe that the weight of the fungus is 125.9 mg DM and it reaches the lowest value at 1 g/L of NH₄Cl, against the endo-β-1,4-glucanase activity passes 0.112 μM glucose / min / gMS at 1.287 μM glucose / min / gMS. The increase in magnesium chloride concentrations decreases the weight growth of *verticillium dahliae* but also its enzymatic activity, the increase in potassium concentrations decreases the weight but not the enzymatic activity. Ammonium nitrate stimulates weight development but doesn't have a great effect on the enzymatic activity of the *verticillium dahliae*. The protein content is effected by the variation of the medium in mineral elements. This work could find applications the development of repressive substrates unfavorable to the development of this disease.

Key words: *verticillium dahliae* kleb, growth, mineral elements, glucanase, glucosidase

RÉSUMÉ

EFFETS DES ÉLÉMENTS MINÉRAUX SUR LE DÉVELOPPEMENT ET L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE *Verticillium dahliae*

L'objectif de cette étude est d'examiner in vitro l'effet d'azote, du potassium et du magnésium à différentes concentrations sur la croissance mycélienne pondérale et l'activité cellulase du *Verticillium dahliae*. Les différentes sources d'éléments minéraux sont incorporées séparément à des concentrations croissantes sur un milieu de culture liquide Czapek-dox pendant 2 semaines d'incubation à 25°C et à l'obscurité. Le chlorure d'ammonium (NH₄Cl) diminue de façon significative la croissance pondérale après 2 semaines d'incubation du champignon mais agit différemment sur son activité enzymatique. Chez le témoin, nous observons que le poids du champignon est de 125,9 mg MS et il atteint la plus faible valeur à 1 g/L de NH₄Cl, par contre l'activité endo-β-1,4-glucanase passe de 0,112 μM glucose/min/gMS à 1,287 μM glucose/min/gMS. L'augmentation des concentrations en chlorure de magnésium diminue la croissance pondérale du *Verticillium dahliae* mais aussi son activité enzymatique, l'augmentation des concentrations de potassium diminue le poids mais pas l'activité enzymatique. Le nitrate d'ammonium stimule le développement pondéral mais n'a pas un grand effet sur l'activité enzymatique du *Verticillium dahliae*. La teneur en protéine est affectée par la variation du milieu en éléments minéraux. Ces travaux pourraient trouver des applications dans la mise au point de substrats répressifs défavorables au développement de cette maladie.

Mots clés : *Verticillium dahliae* Kleb, croissance, éléments minéraux, glucanase, glucosidase.

المخلص

آثار العناصر المعدنية على نمو الفرتسيليوم داهليا ونشاطها الإنزيمي

يهدف هذا البحث إلى دراسة تأثير النيتروجين والبوتاسيوم والمغنيسيوم، بتركيزات مختلفة في المختبر، على زيادة الوزن لدى الغزل الفطري ونشاط السيليلولاز للفرتسيليوم داهليا. يتم دمج مصادر مختلفة من العناصر المعدنية بشكل منفصل بتركيزات متزايدة في وسط استزراع محلول تشابك-دوكس لمدة أسبوعين في حرارة تبلغ 25 درجة مئوية وفي الظلام. يقلل كلوريد الأمونيوم (NH_4Cl) بشكل ملحوظ من زيادة الوزن بعد أسبوعين من حضانة الفطريات ولكنه يؤثر على نشاطه الإنزيمي بشكل مختلف. نلاحظ لدى العينة المرجعية أن وزن الفطريات يبلغ 125.9 ملغ من المادة الجافة و يصل إلى أدنى قيمة عند 1 غ/لتر من NH_4Cl ، بينما يزيد نشاط الإندو-بيتا-1،4-غلوكاناز من 0.112 ميكرومتر من الغلوكوز/دقيقة/غرام من المادة الجافة إلى 1.287 ميكرومتر من الغلوكوز/دقيقة/غرام من المادة الجافة. تقلل الزيادة في تركيزات كلوريد المغنيسيوم من زيادة وزن فرتسيليوم داهليا وكذا نشاطها الإنزيمي، و تقلل الزيادة في تركيزات البوتاسيوم من الوزن ولكنها لا تقلل النشاط الإنزيمي. تحفز نترات الأمونيوم زيادة الوزن ولكن ليس لديها تأثير كبير على النشاط الإنزيمي للفرتسيليوم داهليا. يتأثر تركيز البروتين بتغير وسط العناصر المعدنية. يمكن أن ينتج عن العمل تطبيقات لتطوير الركائز القمعية غير المواتية لنمو هذا المرض.

الكلمات المفتاحية: فرتسيليوم داهليا كلب، نمو، العناصر المعدنية، الغليكاناز، الغليكيوأكسيداز

TABLE DES MATIÈRES

RESUME	
ABSTRACT	
ملخص	
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
I .1- GÉNÉRALITÉS SUR LES CULTURES MARAICHÈRES :	4
I .2- CULTURES MARAICHÈRES DES PLEINS CHAMPS :	4
II- IMPORTANCE DES CULTURES MARAICHÈRES EN ALGÉRIE	5
III- PRINCIPALES MALADIES DES CULTURES MARAICHÈRES.....	6
IV – GÉNÉRALITÉS SUR LA VERTICILLIOSE	6
IV .1- TAXONOMIE	7
IV .2- SPÉCIFICITÉ PARASITAIRE	9
IV.3- SYMPTÔMES DE LA VERTICILLIOSE OBSERVÉS SUR CULTURES MARAICHÈRES	10
IV .4- BIOLOGIE DU <i>VERTICILLIUM DAHLIAE</i> KLEB	12
IV .4.1- CYCLE BIOLOGIQUE DU <i>VERTICILLIUM DAHLIAE</i> KLEB.....	12
IV .4.2- FACTEURS INFLUENÇANT LA BIOLOGIE DU <i>VERTICILLIUM DAHLIAE</i> KLEB.....	13
IV .4.3- AUTRES FACTEURS POSSIBLES DE CONTAMINATION :	13
V - MOYENS DE LUTTE	14
V .1- LUTTE CHIMIQUE	14
V .2- LUTTE BIOLOGIQUE.....	14
V .3- VARIÉTÉS RÉSISTANTES.....	14
V.4- IMPORTANCE ÉCONOMIQUE DE LA VERTICILLIOSE DANS LE MONDE ET EN ALGÉRIE	15
VI. EFFETS DE L'AZOTE, DU POTASSIUM, ET DU MAGNÉSIUM SUR LE DÉVELOPPEMENT DE DIFFÉRENTES MALADIES DES CULTURES	17

VI .1- AZOTE	17
VI .2- POTASSIUM	19
VI.3- MAGNÉSIUM	20
V. INFLUENCE DES FACTEURS ABIOTIQUES (ÉLÉMENTS NUTRITIFS) SUR L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DES AGENTS PATHOGÈNES TELLURIQUES	20
CHAPITRE II:MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	22
OBJECTIF DU TRAVAIL	22
II.1- MATÉRIEL FONGIQUE	22
II.2- EFFET DES ÉLÉMENTS MINÉRAUX SUR LA CROISSANCE PONDÉRALE DE <i>VERTICILLIUM DAHLIAE</i> KLEB	23
II .3- EFFET DES ÉLÉMENTS MINÉRAUX SUR L'ACTIVITÉ CELLULASE DE <i>VERTICILLIUM DAHLIAE</i> KLEB.	25
II.3.1- L'ACTIVITÉ ENDO-B-1,4-GLUCANASE.....	25
II.3.2- L'ACTIVITÉ B-1,4 GLUCOSIDASE.....	25
II .4- DOSAGE DES PROTÉINES.....	25
II.5- ANALYSE STATISTIQUE DES DONNÉES	27
CHAPITRE III RÉSULTATS.....	28
III.1- EFFET DES ÉLÉMENTS MINÉRAUX SUR LA CROISSANCE MYCÉLIENNE PONDÉRALE DE <i>VERTICILLIUM DAHLIAE</i> KLEB	28
III.2-EFFET DES ÉLÉMENTS MINÉRAUX SUR L'ACTIVITÉ ENDO-B-1,4- GLUCANASE ET B-1,4- GLUCOSIDASE	30
III.3- EFFET DES ÉLÉMENTS MINÉRAUX SUR LA TENEUR EN PROTÉINES	33
III.4- EFFET DES ÉLÉMENTS MINÉRAUX SUR LA CORRÉLATION DES PARAMÈTRES ÉTUDIÉS	34
DISCUSSION.....	36
CONCLUSION	43
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUE	
ANNEXES	

LISTE DES FIGURES

Figure 1. 1 Morphologie des conidiphores(a), phalides (b), et conidies (c) de <i>V. dahliae</i>	8
Figure 1. 2 Détail au microscope photonique des microsclérotos formés par <i>Verticillium dahliae</i>	9
Figure 1. 3. Brunissement de racines atteintes par le <i>Verticillium dahlia</i> Kleb	11
Figure 1. 4 Brulure et jaunissement des feuilles de tomate.....	11
Figure 1. 5 Cycle de développement de <i>Verticillium dahliae</i> Kleb.....	13
Figure 2. 1 : Aspect microscopique (X500) du <i>Verticillium dahliae</i> VD124.....	22
Figure 2. 2 : Incubation sous agitation de l'essai.....	23
Figure 2. 3 : Dispositif de filtration sous vide	24
Figure 2. 4 : Formation du complexe coloré entre le bleu brillant de Coomassie et les protéines.....	26
Figure 3. 1 : Effet des éléments minéraux sur la croissance pondérale de <i>Verticillium dahliae</i> Kleb.....	28
Figure 3. 2 : Effet des éléments minéraux sur l'activité endo- β -1,4-Glucanase du <i>Verticillium dahliae</i> Kleb	30
Figure 3. 3 : Effet des éléments minéraux sur l'activité β -1,4 glucosidase du <i>Verticillium dahliae</i>	32
Figure 3. 4: Effet des éléments minéraux sur la Teneur du milieu en protéines en fonction.....	33
Figure 3. 5: Effet des éléments minéraux sur la Corrélation entre les paramètres étudiés.....	35

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. 1 : Pertes économiques causées par la verticilliose.....	16
Tableau 1. 2 : Effet de l'azote sur différentes maladies des cultures.....	17
Tableau 2. 1: Sources des éléments minéraux testées.....	23
Tableau 2. 2 : Concentrations des éléments minéraux utilisées pour la préparation des milieux de culture.....	24

INTRODUCTION

Verticillium dahliae, champignon très polyphage, a été signalé sur tomate dans de nombreux pays producteurs des zones tempérées et subtropicales. Il affecte plusieurs centaines de plantes hôtes herbacées et ligneuses, et notamment plusieurs autres solanacées : le tabac, la pomme de terre, le poivron et surtout l'aubergine, qui est particulièrement sensible. Sur tomate, son incidence a pu être importante.

Pourtant de nos jours la tomate est parmi les cultures maraichères les plus utilisées dans le monde. A cela s'ajoute l'olivier qui est aussi atteint par ce champignon. Il est noté que l'impact de cette maladie est sévère sur l'oliveraie au cours de la première année de son installation, (Bellahcene, 2004). Il en résulte une baisse de production proportionnelle à l'intensité d'attaque. En Algérie, la verticilliose est considérée comme un sérieux problème pour les cultures maraichères et surtout pour la tomate et l'olivier car les dégâts occasionnés sont énormes (Belhassen 2000, 2004, 2014)

Actuellement, il n'existe aucune méthode permettant de lutter efficacement contre cette maladie en Algérie. Elle est toujours au stade prospection notamment sur olivier (Anonyme 2009).

Une étude menée par (Martinez et al., 2002) sur les sols suppressifs envers la gale argentée de la pomme de terre causée par *Helminthosporium solani*. Cet effet suppressif pourrait selon cette étude être attribuable aux propriétés chimiques du sol.

À cet effet, plusieurs études ont montré que la sévérité de certaines maladies des plantes cultivées peut être affectée par certains éléments minéraux essentiels à la croissance de la plante (Ruber et Watson, 1974; Huber, 1978; 1980) et que ces derniers peuvent être exploités pour limiter le développement d'une grande variété de maladies (Engelhard, 1989).

Des exemples remarquables sont des flétrissements fusariens causés par *Fusarium oxysporum* avec des travaux qui datent des années (1920) et qui décrivent l'effet bénéfique de l'utilisation des amendements en chaux (Jones et al, 1989). Le

développement d'un grand nombre de maladies des cultures maraichères comme la gale commune (*Streptomyces scabies*), le Rhizoctone brun (*Rhizoctonia solani*), la gale poudreuse (*Spongospora subterranea*), la Verticilliose (*Verticillium dahliae* et *V.albo-atrum*), l'alternariose (*Alternaria solani* et *A.alternata*), brûlure tardive (*Phytophthora infestans*) est affecté par les éléments minéraux présents dans le sol (Lambert et al. , 2005).

L'effet de ces éléments sur le développement des maladies peut engendrer des changements structuraux ou physiologiques au niveau de la Plante, d'une augmentation de l'activité des antagonistes microbiens ou d'une toxicité directe envers l'agent pathogène par une inhibition de la croissance mycélienne et ces activités biologiques (Lambert et al., 2005). Ainsi, la manipulation ou la modification des propriétés chimiques du sol apparaît comme une pratique culturale intéressante pour le contrôle des maladies des plantes notamment la verticilliose (Huber, 1989). Davis et al, (1986) constatent également que la sévérité et l'incidence de la maladie de la verticilliose sur pomme de terre est en corrélation négative avec certains facteurs agronomiques comme la fertilisation azotée sous forme de chlorure d'ammonium.

D'autres auteurs ont montré que l'association de ces éléments minéraux comme le chlorure de calcium aux fongicides systémiques permet de renforcer leur efficacité contre les agents de pourritures des fruits comme *Alternaria alternata* et *Penicillium expansum* (Biggs et al., 1994 ; Attrassi et al., 2007).

Verticillium est un champignon tellurique qui se conserve dans le sol sous forme de microsclérotés, ces formes de résistance peuvent rester à l'état dormant pendant plusieurs années en l'absence de toute culture sensible. En présence de la plante hôte les microsclérotés peuvent germer et attaquer les plantes par les racines.

La colonisation des tissus par le parasite est rendue aisée par la production d'enzymes de dégradation des parois cellulaires de l'hôte (Cooper et al., 1978 ; Durand & Cooper, 1988). Une corrélation positive existe entre l'activité des cellulases et des pectinases produites par des isolats de *Verticillium* et leur agressivité vis-à-vis de leurs plantes hôtes (Gupta & Heale, 1971, Durand & Cooper, 1988, Regragui, 2012). En outre, ce champignon est apte à produire des métabolites toxiques à l'intérieur des tissus infectés et qui seraient impliqués dans l'expression des

symptômes de la maladie (Nachmias et al, 1982 ; 1984 Meyer et al., 1994 , Regragui, 2012).

La variabilité des caractères morphologiques et physiologiques des pathogènes telluriques ainsi que la croissance mycélienne et les activités biologiques peuvent changer en fonction de la nature du milieu, la concentration en éléments nutritifs du sol, de son Ph, de l'aération, la salinité du sol, la température et de la lumière (Regragui ,2012).

Pour cela il nous a paru intéressant d'étudier les effets de quelques éléments minéraux à savoir l'azote, le potassium, et le magnésium sur la croissance pondérale mycélienne (poids) et les activités enzymatiques in vitro d'un isolat de *Verticillium* sp.

Les résultats préliminaires obtenus pourront servir aux travaux futurs destinés à élaborer des plans spécifiques de gestion des propriétés du sol dans la culture de la pomme de terre ou tomate (cultures les plus importantes en Algérie) pour mieux lutter contre le développement de la verticilliose

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1- GÉNÉRALITÉS SUR LES CULTURES MARAÎCHÈRES :

Le maraîchage (ou maraichage en orthographe rectifiée), ou horticulture maraîchère ou agriculture maraîchère est la culture de végétaux à usage alimentaire, de manière professionnelle, c'est-à-dire dans le but d'en faire un profit ou simplement d'en vivre, ce qui le distingue du jardinage.

Le maraîchage s'est d'abord développé dans la proche périphérie des villes pour approvisionner les marchés en légumes frais, souvent dans des zones marécageuses (zone humide), comme les hortillonnages d'Amiens ou le plus souvent dans les plaines alluviales des fleuves comme les jardins maraîchers de la Baratte au bord de la Loire à Nevers. Ce type de maraichage se caractérise par la petite surface des exploitations de type familial, par sa production diversifiée et souvent par la vente directe traditionnelle, les maraîchers tenant eux-mêmes un étal dans les marchés locaux. (J. Dumonthay 1973)

Alors que la culture de plantes alimentaires en potager concerne plutôt l'autoconsommation, le maraichage concerne les cultures pour la vente à la consommation. Les producteurs maraîchers vendent leurs récoltes soit en "circuit long" à des chaînes de supermarchés, à des centrales d'achat (grossistes en alimentation) ou à l'industrie agroalimentaire, soit en "circuit court", directement de l'agriculteur aux consommateurs. (Anonyme 2019)

I.2- CULTURES MARAÎCHÈRES DES PLEINS CHAMPS :

Elles se distinguent des cultures légumières par leur intensification ; en effet elles se caractérisent par :

- Des exploitations spécialisées dans la production des cultures maraîchères.
- Les investissements élevés.
- Des terres de bonnes qualités.
- Situation dans un climat favorable.

- Large emploi des fumures, produits phytosanitaires et technicité. (Anonyme 2011)

- **Les cultures maraîchères abritées** : ce sont des cultures qui se font à des époques anormales en utilisant des matériaux destinés à transformer le micro climat local en un climat plus proche des exigences de la plante .Ces matériaux peuvent être des serres, des tunnels ou des châssis. On distingue deux grands groupes de cultures sous abris :

- **Les cultures hâtées** : ce sont des cultures abritées qui n'utilisent pas de sources de chaleur artificielles (presque 100%des cultures abritées)

- **Les cultures forcées** : ce sont des cultures abritées qui utilisent des sources de chaleur artificielle (Anonyme 2011)

II- IMPORTANCE DES CULTURES MARAICHÈRES EN ALGÉRIE

Les cultures maraîchères sont cultivées dans toutes les régions d'Algérie, on les trouve aux alentours des centres urbains et là où il y a possibilité d'irrigation (barrages, oueds, sources ou moyens de pompage).

Le maraîchage à une grande importance dans l'économie nationale car il permet :

- La création d'un grand nombre d'emploi chaque année.
- La satisfaction des besoins en légumes des populations du pays.
- L'entrée de devises par le biais des exportations.
- L'approvisionnement de l'industrie agroalimentaire et la transformation en matière première (Anonyme 2011).

Elles ont connu un développement important au cours des dernières années. La production totale est passée de 6 millions de tonnes en 2007/2008 à 9,5 millions en 2010/2012, soit une augmentation de 58 %. La pomme de terre, produit de grande consommation, est l'espèce la plus représentée avec une production de 3,8 millions de tonnes.

III- PRINCIPALES MALADIES DES CULTURES MARAICHÈRES

Les cultures maraichères sont affectées par de nombreuses maladies fongiques, bactériennes et virales qui affectent la plante en totalité ou en parties (racines, tiges, feuilles et tubercules) pendant la phase de culture au champ et/ou pendant la phase de conservation des tubercules (Gaucher, 1998). Les principales maladies fongiques sont la brûlure tardive (*Phytophthora infestans*), le rhizoctone brun (*Rhizoctonia solani*), la gale argentée (*Helminthosporium solani*), pourriture sèche (*Fusarium sambucinum*), l'altémariose (*A. solani*, *A. alternata*), la pourriture à sclérotés (*Sclerotinia sclerotium*), la verticilliose (*Verticillium* spp.), la pourriture aqueuse (*Pythium ultimum*), la pourriturerose (*Pythium erythroseptica*). Les principales maladies bactériennes sont la jambe noire (*Erwinia carotovora*), la gale commune (*Streptomyces scabies*) et la pourriture brune (*Ralstonia solanacearum*). Les principales maladies virales sont les mosaïques bénignes (Gaucher, 1998).

IV – GÉNÉRALITÉS SUR LA VERTICILLIOSE

La verticilliose, causée par *Verticillium dahliae* Kleb est l'une des maladies vasculaires les plus importantes rapportée sur des plantes appartenant à 45 familles botaniques (Harrington et Dobinson 2000). Cette espèce est d'une importance économique majeure (Mc Cain et al., 1981) et est distribuée dans le monde entier (Pegg, 1984). La verticilliose ou flétrissement verticillien est une maladie cryptogamique vivant majoritairement dans le sol et se propage par les racines lors de la montée de sève.

Longtemps considérée comme une maladie d'importance secondaire la verticilliose est devenue une maladie économiquement importante suite au développement du *Verticillium* (Pegg et Brady 2002).

Le champignon de *V. dahliae* est un parasite facultatif, saprophyte du sol et biotope des plantes (Hiemstra et Harris 1998). Son développement *in vivo* nécessite un sol humide. Son développement *in vitro* a un taux de croissance relativement lent. Il se développe différemment sur les milieux communs aussi bien organiques (Richards, Czapek) que synthétiques (PDA, MEA) (Malick 2008). Sa croissance *in vitro* est optimale aux températures de l'ordre 21 à 27°C (Bejarano-Alcazar et al., 1996) ; Avec un pH compris entre 6 et 9 (Pegg et Brady 2002). La croissance est

inhibée par des températures extrêmes telles que 5 ou 35 °C (Malick2008) et des pH en dessous de 5 (Pegg et Brady2002).

IV .1- TAXONOMIE

L'agent infectieux *Verticillium dahliae* a été décrit pour la première fois comme une espèce distincte par Klebhan(1913).C'est un champignon imparfait, haploïde et dimorphe,(Pegg et Brady,2002,Klosterman et al.,2009).

La classification de ce champignon est établie par Agrios 1988 ; puis Botton 1990 est la suivante :

Division : Amastigomycota
Group : Deutéromycètes
Classe : Hyphomycètes
Ordre : Hyphales ou Moniliales
Famille : *Moniliaceae*
Genre : *Verticillium*
Espèce : *dahliae* (Kleb)

Du point de vue morphologique, le champignon porte des conidiophores disposés en verticilles autour de l'axe principal de l'hyphe. Une phialide se trouve à l'extrémité de chacune de ces branches et les conidies sont formées une par une à l'extrémité de la phialide. Les conidies peuvent s'agglomérer à l'extrémité des phialides. Par ailleurs,

V. dahliae produit sous certaines conditions des microsclérotos. Cette particularité permet de le distinguer de *Verticillium alboaltrum*, un autre pathogène causant des symptômes similaires sur les plantes (Pegg et Brady, 2002).

Les microsclérotos sont des structures de survie formées par l'agglomération d'hyphes contigus dont les parois sont épaissies et mélanisées. Les agglomérats formés ont l'aspect de petites boules noires (entre 20 et 200 picomètre de diamètre) pouvant être séparées des hyphes. Leur germination peut être induite artificiellement sur certains milieux sélectifs. Leur persistance dans le sol varie de 4 à 15 ans (Hawke et Lazarovits, 1994; Pegg et Brady, 2002).

Le genre *Verticillium* appartient au groupe des champignons imparfaits et possède deux types d'organes reproducteurs :

- les microconidies, unicellulaires, ovales ($4-6\mu\text{m}\times 2-3\mu\text{m}$) contenues dans une gouttelette muqueuse, portées à l'extrémité des phialides (la sphérule) (Figure 1.1)
- Les microsclérotés, de forme et de tailles variables, reconnaissables par leur couleur noire, due à un pigment : la mélanine. Ils se forment par augmentation de taille, épaissement et mélanisation de la paroi des hyphes (Goudou-Sinha, 1988). (Figure 1.2)

Les champignons du genre *Verticillium* sont connus par leur grande facilité de variations. Ces variations touchent aussi bien la morphologie des thalles que le pouvoir pathogène (Boisson et Lahlou, 1980 ; 1982; Lahlou et Boisson, 1981).

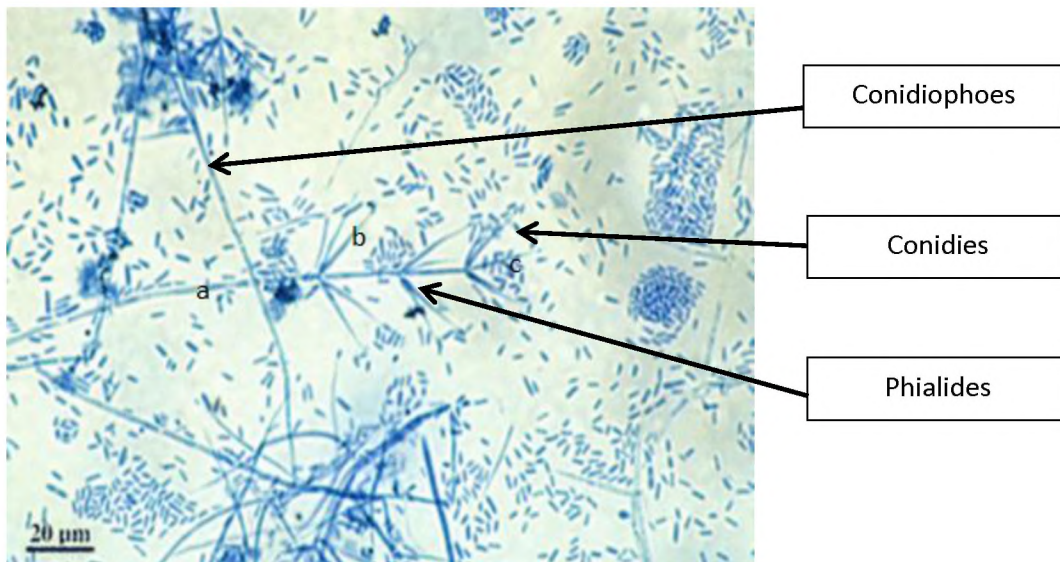


Figure 1. 1 Morphologie des conidiphores(a), phalides (b), et conidies (c) de *V. dahliae*. (Jabnoun-khiareddine, H., et al 2010)



Figure 1. 2 Détail au microscope photonique des microsclérotos formés par *Verticillium dahliae* (D. Blancard, 2015)

IV .2- SPÉCIFICITÉ PARASITAIRE

Le dahlia fut la première plante hôte attaquée par *Verticillium dahliae* (Isaac, 1976). Originaire des hauts plateaux du Mexique, les Aztèques le cultivent aussi comme une plante ornementale. Le dahlia a été découvert par des botanistes espagnols dans la "Nueva españa", le Mexique actuel.

Cette fleur à bulbe héliophile appartient à la famille des Composées et était appelée par les indigènes "Acocotli et Chichipatli". Le Dahlia doit son nom à Andreas Dahl, botaniste du XVIIIème siècle. C'était un élève du célèbre botaniste suédois Carl von Linné, qui a établi la classification moderne des plantes.

À Versailles, le Dahlia était présenté comme un légume racine, consommé par les indigènes. Le goût étant acre, on a cultivé cette fleur à bulbe pour ses coloris (Rhizomes 2008).

Ce parasite est extrêmement polyphage puisqu'il peut attaquer plus de 400 espèces de plantes appartenant à des genres et familles différentes dont beaucoup ont un intérêt agricole et économique (Martin-Lapierre,2011) comme des arbres fruitiers (l'olivier, l'amandier, l'abricotier (Tjamos1989), des plantes herbacées aussi bien maraichères (pommes de terres,poivron, tomates, aubergines) qu'ornementales (Chrysanthèmes ,rosier et lychnis) (Fradin et Thomma 2006,Wang et *al.*,2012), des légumes chou-fleur, artichaut (jamos.,2000).

IV.3- SYMPTÔMES DE LA VERTICILLIOSE OBSERVÉS SUR CULTURES

MARAICHÈRES

Verticillium dahliae est un des champignons responsables de la verticilliose (*Verticillium wilt*) sur plusieurs légumes, dont la tomate. Cette maladie est signalée dans de nombreuses zones de production du monde et peut occasionner des dégâts importants. Elle affecte aussi bien les cultures de plein champ que sous abri. Comme de nombreuses autres maladies vasculaires, les attaques de verticilliose sur tomate se traduisent par le flétrissement des plantes au moment les plus chauds de la journée. Les folioles ne tardent pas à présenter un jaunissement internervaire du limbe, qui prend la forme d'un « V ». Progressivement, les tissus foliaires se nécrosent et se dessèchent dans la partie centrale des décolorations. Au fur et à mesure de la progression de la maladie, plusieurs folioles et feuilles montrent des symptômes comparables. Une coupe longitudinale dans la tige permet de constater que les vaisseaux sont plus ou moins bruns, les brunissements vasculaires sont observés (Figure 1.3) (.Blancard,2013).

L'obstruction des vaisseaux provoque des flétrissements rapides. Chez les légumes, deux familles de champignons sont en cause : les fusarioses et la verticilliose. Pour cette dernière, le coupable est *Verticillium dahliae*, qui s'en prend surtout aux solanaceae : tomates, aubergines et parfois poivrons. La verticilliose peut aussi s'attaquer aux artichauts et aux melons. (Terre vivante 2008)

Les symptômes sont variables selon les plantes-hôtes. Les plus caractéristiques chez toutes les espèces sensibles sont une chlorose foliaire précoce suivie de nécrose (Figure1.4), puis par la chute prématurée des feuilles atteintes, ainsi que la décoloration vasculaire des tiges et des racines (Figure 1.3) .

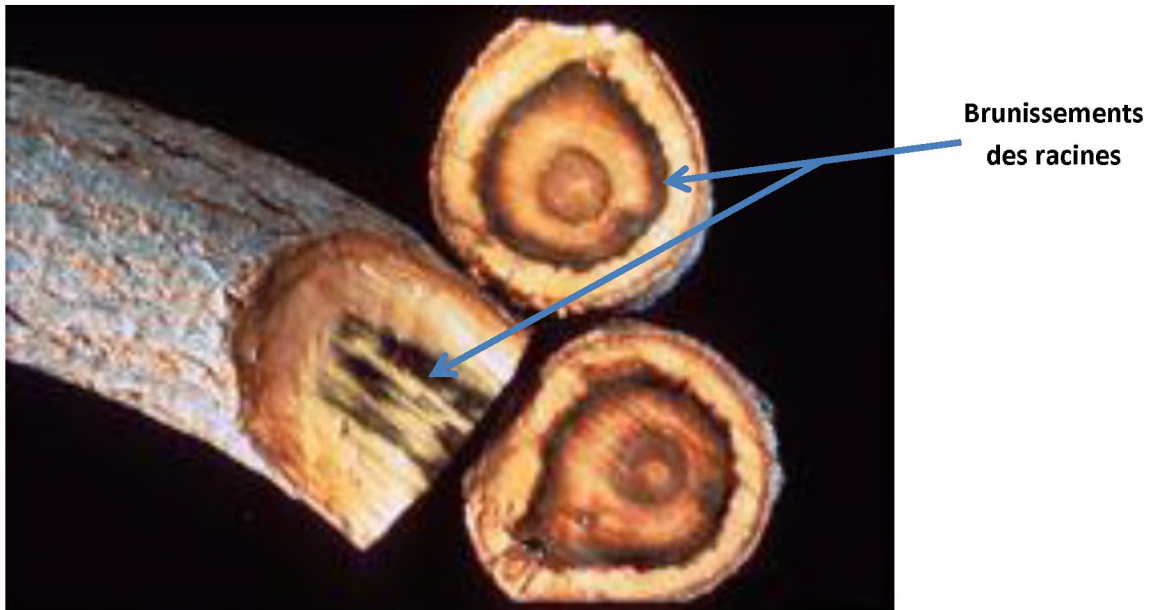


Figure 1. 3. Brunissement de racines atteintes par le *Verticillium dahlia* Kleb (Blancard 2013)



Figure 1. 4 Brulure et jaunissement des feuilles de tomate (Blancard 2013)

IV .4- BIOLOGIE DU *Verticillium dahliae* Kleb

IV .4.1- CYCLE BIOLOGIQUE DU *Verticillium dahliae* Kleb

Le cycle biologique du *V.dahliae* se déroule en deux phases (Hiemstra et Harris,1998),une phase saprophytique comprenant une période d'activité ,et une phase parasitaire qui se déroule dans la plante hôte.

Pendant la phase saprophytique, le champignon pérennise sous sa forme de micro sclérote plus de 14ans dans le sol aux dépens des débris végétaux et matériaux organiques (Wilhelm,1955,Triki et *al.*,2006).C'est ainsi qu'il se dissémine par le mouvement des sols infectés, des débris végétaux infectés ,de l'eau d'irrigation, l'équipement agricole, le vent, les insectes telluriques ,prédateurs, pollinisateurs (Klosterman et *al.*,2009 ;Chawla et *al.*,2012).Il résiste bien au froid qu' à la chaleur et supporte des écarts thermiques allant de 30°C à 55°C (Schnathorst et Mathre,1966).Le saprophyte s'active et redevient agressif au rétablissement de bonnes conditions de température et d'humidité du sol. La phase parasitaire du champignon se débute par la germination de microsclérotés en réponse aux exsudats racinaires de la plante hôte. Il en résulte une émission des hyphes qui colonisent le cortex des racines s'y introduit par l'extrémité ou par les cellules épidermiques (Garber,1966) et puis gagne via la sève les vaisseaux du xylème ;infection primaire (Fradin et Thomma,2006 ; Vallad et Subbarao, 2008) (figure 4). Le parasite se reproduit asexuellement dans les vaisseaux à l'intérieur desquels il progresse ,grâce au transport de conidies par le flux de la sève ascendante aux pièces aériennes de la plante (Vallad et Subbarao,2008) où elles constituent des foyers secondaires d'infection (figure 4). La poursuite ainsi de l'infection du systèmes vasculaire et les toxines émises par le parasite font que la plante produise des dépôts gommeuses qui obstruent les vaisseaux conducteurs y entravant ainsi le transport d'eau (Klosterman et *al.*,2009) et donc des symptômes de flétrissement se déclenchent sur les parties aériennes atteintes (Tombesi et *al.*,2007 ;Laoune et *al.*,2011) (Figure 1.5)

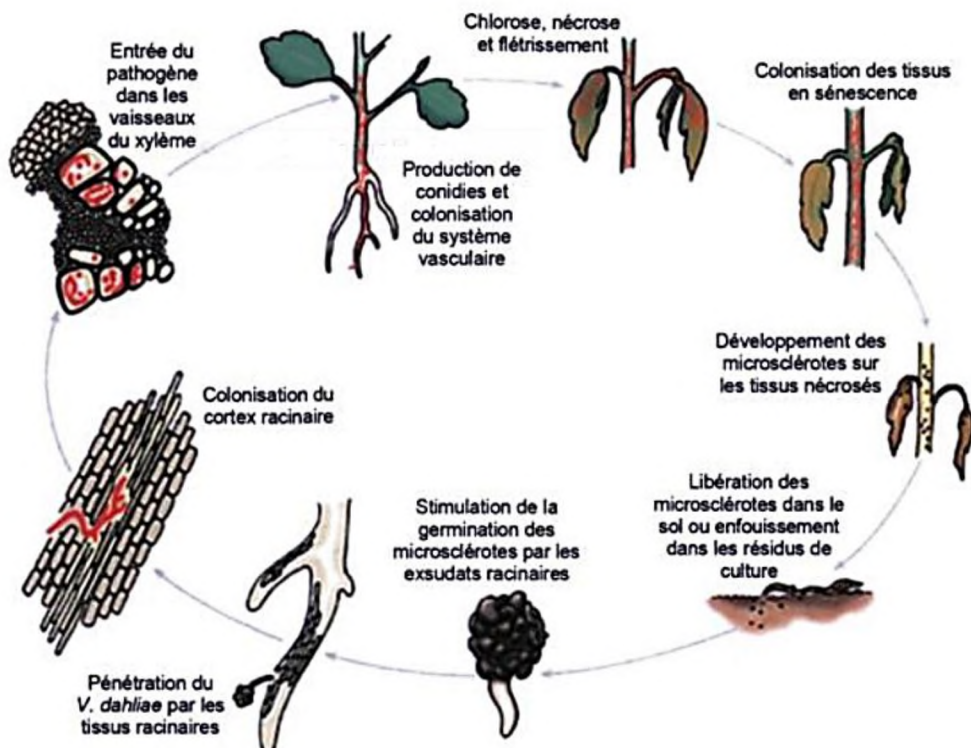


Figure 1. 5 Cycle de développement de *Verticillium dahliae* Kleb (Berlanger et Powelson, 2000).

IV .4.2- FACTEURS INFLUENÇANT LA BIOLOGIE DU *Verticillium dahliae* Kleb

La croissance et la fructification du *Verticillium* sur les racines sont étroitement liées aux conditions de température et d'humidité (Jouan et al,1974). Sa croissance in vitro dépend du pH qui doit être acide et de la composition du milieu de culture (Singh,1973). Lorsque le microsclérote entre en contact avec les racines d'une plante hôte et lorsque les conditions sont favorables (température avoisinant 20°C et sol humide), il germe et produit le mycélium qui se propage dans la plante. *Verticillium dahliae* produit ensuite de nouveaux microsclérotés dans les parties contaminées de la plante. Lorsque celle-ci meurt et se décompose, ces nouveaux microsclérotés sont relâchés dans le sol.

IV .4.3- AUTRES FACTEURS POSSIBLES DE CONTAMINATION :

les excréments d'animaux ayant consommé des plantes malades, la diffusion des semences de plantes malades, la présence de « mauvaises herbes » hôtes (chénopodes, plantains, amarantes, séneçons), les nématodes et pucerons (vecteurs) (C, 2016.) Le *Verticillium* se développe sur un sol hydromorphe, irrigation, humidité régulière, température douce 20-30 (INRA 2013).

V - MOYENS DE LUTTE

V.1- LUTTE CHIMIQUE

En pratique la lutte chimique constitue et de loin le type de méthode le plus utilisé pour la gestion de la verticilliose (Yangui et *al.*,2010 ,Alfano et *al.*,2011).Elle se fait par stérilisation du sol à l'aide de fumigants chimiques (le bromure méthylique) (Fravel et Larkin 2000, Martin Lapierre2011) ou l'utilisation des fongicides systémiques (méthyl thiophanate, thiabendazole, bénomyl et carbendazime) (Henni 1982,Boukenadel,2001 ;kumar et *al.*,2012).Ce recours aux produits chimiques , toujours valables dans certaines situations ,engendrent cependant des couts élevés et des impacts sur l'environnement (Nannipierri et *al.*,1990). Actuellement aucun traitement curatif n'a prouvé son efficacité (Arsaland et Dervis,2010). *In vivo*, le compost utilisé comme amendement du sol réduit le rabougrissement et l'altération foliaire des plants de tomate inoculés par *V. dahliae* . La correction du sol avec le compost a permis l'inhibition de la pénétration et de la colonisation des tissus vasculaires des plants de tomate par *V. dahliae* (Mouira et *al.*, 2014).

V.2- LUTTE BIOLOGIQUE

La lutte biologique peut offrir de nombreuses méthodes de lutttes alternative aux traitements chimiques (Uppal et *al.*, 2008).Ce moyen de lutte met en œuvre différents organismes vivants appelés auxiliaires ou leur produits pour prévenir ou réduire les dégâts. Il s'agit d'utiliser surtout les microorganismes tels que *Pseudomonas sp* et *Bacillus sp* (Mercado-Blanco et *al.* ,2004 ;Bounoua 2008 ;Lang et *al.*, 2012) , *Streptomyces plicatus* , *Frankiasp* (Bonjar et Aghighi,2005) ,*Serratiaplymuthica* (Muller et *al.*,2007).Ce moyen de lutte a malheureusement dévoilé un succès limité contre la verticilliose (Sanei et *al.*,2010).

V.3- VARIÉTÉS RÉSISTANTES

Intercalez des cultures résistantes : haricot, laitue, oignon, ail, poireau, engrais verts...

•Pour les tomates, en dernier recours la solution de renoncer aux variétés anciennes et d'utiliser des variétés tolérantes. Pour les aubergines, l'utilisation de plants greffés sur tomates permet à la fois d'augmenter vigueur et productivité tout

en résistant beaucoup mieux à la verticilliose. Les plants greffés se trouvent de plus en plus fréquemment sur les marchés, y compris en bio (Galinet 1987).

•La variété de tomate Roma vf est résistante aux maladies comme le mildiou, mais aussi au *Verticillium* et au Fusarium, d'où l'abréviation « vf ». Sa croissance est déterminée, ce qui signifie que la plante peut se cultiver sans taille et sans tuteurage. Dans ce cas, elle se développe au ras du sol et stoppe spontanément sa croissance dès qu'elle atteint une longueur de 1 m à 1,50 m (5 à 6 grappes florales). Dotées de cinq pétales, les fleurs sont jaunes ; les feuilles sont découpées et poilues. (Anonyme 2007).

V.4- IMPORTANCE ÉCONOMIQUE DE LA VERTICILLIOSE DANS LE MONDE ET EN ALGÉRIE

De toutes les espèces du genre *Verticillium*, *V. dahliae* est la plus néfaste à cause de son large spectre d'hôtes et de la persistance de ces microsclerotia. Dans le monde, la verticilliose est la maladie la plus destructrice en ce qui concerne les cultures de tomate et la deuxième en ce qui concerne la pomme de terre. Les cultures les plus touchées en termes de pertes annuelles sont de loin la tomate et la pomme de terre avec une perte annuelle mondiale estimée à plus de 700 millions d'euros (Tableau 1.1).

Tableau 1. 1 : Pertes économiques causées par la verticilliose.

Plante hôte	Production annuelle globale (moyenne 2005*2010)		Perte estimée		Perte maximale
	Million de Tonnes	Million de dollars	Million de Tonnes	Million de dollars	%
Tomate	140.95	71.07	1.41	710.72	70
Pommes de terre	326.02	70.7	3.26	707.03	50
Coton	23.52	35.47	0.24	354,72	30
Colza	54.98	20.65	0.55	206.53	50
Pastèque	95.62	21.16	0.96	211.61	
Olivier	17.7	21.05	0.18	210.46	75
Piments et poivrons	27.65	17.88	0.28	178.77	20
Concombre	55.53	17.26	0.56	172.6	
Choux	64.66	16.89	0.65	168.93	
Laitue	23.56	13.95	0.24	139.47	100
Tabac	6.69	12.48	0,07	124.78	30
Aubergine	38.32	12.22	0.38	122.15	70
Tournesol	31.7	10.33	0.32	103.3	55
Fraise	4.14	8.75	0.04	87.48	
Épinards	17.16	6.41	0.17	64.1	
Chou-fleur (et brocoli)	18.56	6.39	0.19	63.93	
Pistachier	0.73	3.26	0.01	32.62	
Avocat	3.73	3.01	0.04	30.08	
Lentilles	3.07	1.96	0.04	19,61	
Artichaut	1.44	1.15	0.01	11.45	
Houblon	0.13	586	0	5.86	100
Alfalfa	nb	nb	nb	nb	50

Données compilées par Magda Siebold (non publié) d'après les chiffres du FAO
Données présentées au 11 th International *Verticillium* Symposium 2013

En Algérie, la *verticilliose* fut signalée pour la première fois par Boullinger (1970) et par Subramoniam (1974) sur les cultures de tomates. Ce n'est qu'en 1990 que la *verticilliose* de l'olivier n'a été signalée en Algérie par Benchaabane et plus par Matallah et *al.* (1996), puis Bellahcene et *al.* (1997, 1998, 2000).

En Algérie, *la verticilliose* est considérée comme un sérieux problème pour les cultures maraichères et surtout pour la tomate, pomme de terre car les dégâts occasionnés sont énormes (Belhassen2000, 2004, 2005).

VI. EFFETS DE L'AZOTE, DU POTASSIUM, ET DU MAGNÉSIUM SUR LE DÉVELOPPEMENT DE DIFFÉRENTES MALADIES DES CULTURES

VI .1- Azote

L'azote a été intensivement étudié dans la relation "nutrition de l'hôte-sévérité de la maladie" depuis plusieurs années (Huber et Watson, 1974). L'azote présente différents effets selon la culture et l'agent pathogène étudié (Tableau 1. 2).

Tableau 1. 2 : Effet de l'azote sur différentes maladies des cultures (Huber et Watson, 1974).

Maladie	Hôte	Pathogène	Forme d'azote	
			Nitrate	ammonium
Maladies des semis et fonte de semis	Betterave à sucre	<i>Rhizoctonia solani</i>	Diminue	Augmente
Pourritures racinaires	Petit pois Soya	<i>Aphanomyces Euteiches</i>	Diminue	Augmente
	Petit pois	<i>Pythium ultimum</i>	Augmente	Diminue
	Mais Pomme de terre mais	<i>A.euteiches</i>	Diminue	Augmente
	Citronnier	<i>Pythium spp.</i>	Augmente	Diminue
	Citronnier			
	Haricot Haricot	<i>Phytophthora citrophthora</i>	Diminue	Augmente

		<i>Fusarium spp.</i>	ND	Augmente
		<i>R.solani</i>	Diminue	Augmente
		<i>Fusarium solani</i> <i>f.sp phasoli</i>	Diminue	Augmente
Pourriture de la tige	Maïs	<i>Fusarium spp.</i>	Diminue	Augmente
	Maïs	<i>Diplodia Zeae</i>	Augmente	Diminue
	Pin	<i>Poria weirii</i>	Diminue	Augmente
	Pin	<i>Armillaria mellea</i>	Diminue	Augmente
	Blé	<i>Fusarium spp.</i>	Diminue	Augmente
	Blé	<i>Helminthosporium sativum</i>	Diminue Diminue	Augmente ND
Piétin-verse	Blé	<i>Cercospora herpotrichoides</i>	Diminue	Augmente
Pourriture racinaire	Tabac cultivé (<i>Nicotiana tabacum</i>)	<i>Thielaviopsis basicola</i>	Diminue	Augmente
	Coton	<i>Phymatotrichum omnivorum</i>	Augmente	Diminue
Pourriture de la tige et de la racine	Pomme de terre	<i>R.solani</i>	Diminue	Augmente
Piétin-échaudage	Blé	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	Augmente	Diminue
Rhizoctone ocelle	Blé	<i>Rhizoctonia cereadis</i>	Diminue	Augmente
Racine noir	Betterave a sucre	<i>Aphanomyces Cochlioides</i>	Diminue	Augmente
Taches	Gazon	<i>G.graminis</i>	ND	Diminue
Rouille meridionale	Tomate	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Diminue	Augmente
	Pomme	<i>Streptomyces</i>	Augmente	Diminue

Gale commune	de terre	scabies		
Flétrissement	Oëillet	<i>Phialophora Cinerescens</i>	Augmente	Diminue
	Coton	<i>F.oxysporum f.sp.</i>	Diminue	Augmente
	Tomate	<i>Vasinfectum F.oxysporum f.sp.</i>	Diminue	Augmente
	Pomme de terre	<i>Lycopersici</i>	Augmente	Diminue
	Tomate	<i>Verticillium spp.</i>		

En outre, d'autres études effectuées sur l'azote ont montré qu'une concentration élevée d'azote (450 ppm) n'a pas significativement augmenté la maladie de chancre (*Clavibacter michiganense*) chez la tomate comparativement à une concentration de 240 ppm d'azote (Berry *et al.*, 1988). Duffy et Défago (1999) ont montré que la maladie du pourridié fusarien (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*) chez la tomate Augmente suite à l'augmentation de la concentration d'ammonium [NH₄Cl ; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ ; (NH₄)₂S₀₄]. Elle a par ailleurs été réduite par une application du nitrate de calcium et de petites concentrations de nitrate d'ammonium (39 à 79 mg d'azote/l). Cependant, des concentrations supérieures à 100 mg d'azote/l ont augmenté la sévérité de cette maladie. Hoffland *et al.* (1999) ont montré que l'augmentation de la concentration d'azote appliqué diminue la sévérité de la moisissure grise causée par *Botrytis cinerea* chez la tomate. Par contre, l'azote n'a pas eu d'effet sur le flétrissement fusarien causé par *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* chez la tomate alors que l'augmentation de la concentration d'azote a favorisé l'augmentation de la moucheture (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) et du blanc (*Oïdium lycopersicum*) chez la tomate (Hoffland *et al.*, 2000). Nam *et al.* (2006) ont montré que des concentrations élevées d'azote dans la solution nutritive ont augmenté la sévérité de l'anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) chez une culture de fraiser en système hydroponique fermé.

VI .2- Potassium

Sanogo et Yang (2001) ont montré que la nutrition potassique a un effet sur le syndrome de la mort subite du soya [*F. solani* f. sp. *glycines* Fsgy.] L'application du chlorure de potassium a favorisé une réduction moyenne de 36 % de la sévérité de la maladie comparativement au traitement témoin. Par contre, la sévérité de la

maladie a connu une augmentation moyenne de 32 % avec l'application du phosphate de potassium, de 43 % avec le sulfate de potassium et de 45 % avec le nitrate de potassium. La germination in vitro des conidies du *Fsg* n'a pas été affectée de façon significative par les éléments nutritifs potassiques; par contre la croissance mycélienne a été favorisée sur milieu de culture amendé de nitrate de potassium (Sanogo et Yang, 2001).

VI.3- Magnésium

Selon Wisniewski *et al.* (1995), le chlorure de magnésium (25-175 mM) n'a pas eu d'effet sur la germination et la croissance du tube germinatif in vitro de *B. cinerea* et de *P. expansum*. La fertilisation avec du chlorure de magnésium a augmenté le flétrissement fusarien causé par *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* chez la tomate (Jones *et al.*, 1989) et par *F. oxysporum* f. sp. *apii* chez le céleri (Schneider, 1985). Selon Duffy et Défago (1999), le sulfate de magnésium n'a pas eu d'effet sur le pourridié fusarien (*F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*) chez la tomate. Taylor (1954) a montré que la susceptibilité du maïs à la brûlure des feuilles (*Helminthosporium maydis*) diminue lorsque le niveau de magnésium augmente dans les tissus foliaires.

V. INFLUENCE DES FACTEURS ABIOTIQUES (ÉLÉMENTS NUTRITIFS) SUR L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DES AGENTS PATHOGÈNES TELLURIQUES

Lorsque le *verticillium dahliae* entre dans la plante hôte, la première ligne de défense qu'il rencontre est la paroi cellulaire, celle-ci est composée de trois polysaccharides : Cellulose, Hémicellulose, matières pectiques et d'autres composés (Schäfer, W.1994).

Les champignons phytopathogènes sont connus pour produire une large gamme d'enzymes extracellulaires essentielles à l'infection qui dégradent la paroi cellulaire en facilitant la pénétration et en libérant des composés solubles utilisés comme nutriments pour soutenir la croissance fongique (Lehtinen, 1993).

La cellulase est une enzyme qui dégrade la paroi cellulaire, complexe, composée de trois types d'enzymes avec une activité variable dans l'Hydrolyse de la chaîne de la cellulose :

- exo- β -1,4- glucanases divisent les liaisons β -1,4- glycosidiques à la fin non réductrice de la molécule de cellulase pour donner une cellobiose
- endo- β -1,4-glucanases attaquent les liaisons glycosidiques internes
- β -1,4- glucosidases coupent la cello-oligosaccharides en glucose

Tous les trois des classes d'enzymes sont nécessaires pour la dépolymérisation complète de la cellulose (De Lorenzo et al, 1997). Ils peuvent être sécrétés dans le milieu situé au niveau intercellulaire ou lié à la paroi cellulaire avec une action synergique se déroulant entre les trois. La cellulose hydrolysée est généralement un processus lent en raison de la nature cristalline des polymères.

Les enzymes produits par des champignons phytopathogènes, dégradant la paroi cellulaire sont considérés comme facteurs de pathogénicité important.

Le rôle des enzymes cellulolytiques dans la détermination de l'agressivité des isolats de *Verticillium* a fait l'objet de plusieurs études (Mussel, 1973 ; Russel, 1975 ; Balandina et al., 1976 ; El Aissami, 1998 ; Regragui et al., 2003, Regragui 2012).

Mussel (1973), a montré qu'il y a une corrélation positive entre l'activité enzymatique des isolats de *Verticillium* et leur agressivité vis-à-vis du coton. Dans le même sens, Witney et al., (1972) ont déduit que la carboxyméthylcellulase est d'autant produite par *Verticillium albo-atrum* que l'infection de la luzerne est forte.

Les facteurs abiotiques ont un grande influence sur laa pouvoir pathogènes des champignons telluriques

Ainsi *Sclerotium rolfsii* et *Rhizoctonia solani*, deux champignons du sol pathogènes sur la betterave, voient leur aptitude à dégrader les parois cellulaires de leur hôte Perturbée par le sel *in vitro*. Chez *S. rolfsii*, l'activité enzymatique augmente avec l'augmentation de la salinité du milieu, alors que celle de *R. solani* diminue.

L'activité enzymatique de *Verticillium* peut être également perturbée à la suite d'un stress autre que la salinité. Ainsi, l'activité caséine kinase de *Verticillium dahliae*, parasite du coton, peut disparaître sous l'effet d'un choc thermique (Vasiliev et al.1992).

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

OBJECTIF DU TRAVAIL

Cette étude *in vitro* vise à évaluer l'effet de l'azote, du potassium et du magnésium sur la croissance pondérale mycélienne, L'activité endo- β -1,4-glucanase, β -1,4 glucosidase et l'activité protéase de *Verticillium dahliae*. Ces paramètres sont choisis par rapport à leurs étroites relations avec le pouvoir pathogène de ce champignon tellurique

II.1- Matériel fongique

Un isolat de *Verticillium dahliae* (VD₁₂₄) (Figure 2.1) a été fourni par Mr. DEGAICHIA du laboratoire de Biotechnologies des Productions Agricoles de l'université de Blida 1. Il a été isolé à partir d'une culture de tomate de la région de Tébessa présentant des symptômes de flétrissement et de brunissement au niveau du collet, caractéristiques de la verticilliose. Sur la base des structures morphologiques et microscopiques du champignon retrouvé sur le milieu de culture, et la clé de détermination de (Rieuf, 1985) on peut confirmer le genre *Verticillium* par la production de microsclérotos. Cette souche a été conservée à 25°C à l'obscurité sur milieu de culture **PDA (Annexe1)**.

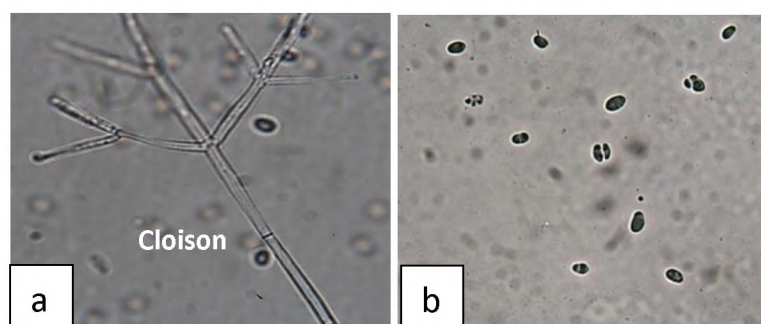


Figure 2. 1 : Aspect microscopique (X500) du *Verticillium dahliae* VD124 (a :conidiophore et conidies ; b : microsclérotos)

II.2- Effet des éléments minéraux sur la croissance pondérale de *Verticillium dahliae* Kleb

Pour évaluer l'effet des éléments minéraux sur le poids mycélien du *Verticillium dahliae*, le champignon a été incubé dans 25 ml du milieu liquide Czapek-dox (**Annexe 2**) où le glucose a été remplacé par du carboxyméthylcellulose (CMC) à 0,5% (poids /volume) dont la composition et la concentration en azote, potassium, magnésium varient selon l'expérimentation (Tableau 2.1 et 2.2), puis mis dans une chambre de culture dans l'obscurité sous agitation de 190 rpm à 25 °C (Figure 2.2). (Novo M. et al., 2006)

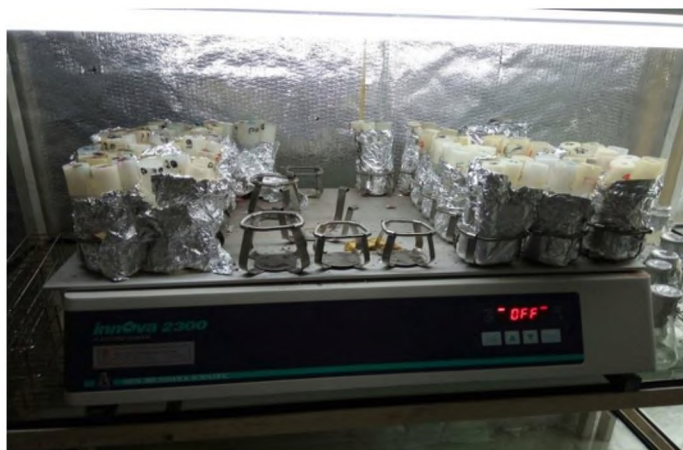


Figure 2. 2 : Incubation sous agitation de l'essai

Les erlenmeyers ont été numérotés, chaque numéro correspond à une valeur (concentration, type d'élément minéral). Sept répétitions ont été effectuées pour chaque concentration y compris le témoin (champignon inoculé dans un milieu Czapek-dox de base)

Tableau 2. 1: Sources des éléments minéraux testées

Élément minéral	Sources
Azote	NH ₄ Cl (Laboratoire Mat)
	NH ₄ NO ₃ (Laboratoire Mat)
Potassium	K ₂ SO ₄ (Sigma Chemical Co.)
Magnésium	MgCl ₂ -2H ₂ O (Sigma Chemical Co.)

Tableau 2. 2 : Concentrations des éléments minéraux utilisées pour la préparation des milieux de culture

Élément minéral	Concentrations (g/L)		
	C0	C1	C2
Azote	0	0.33	3,5
Potassium	0	0,7	7,11
Magnésium	0	0,05	1

Les cultures ont été incubées pendant 2 semaines sous agitation et les échantillons ont été collectés à la fin de l'expérimentation. Le mycélium a été séparé du milieu par filtration sous vide en utilisant une membrane millipore de 0,22 μm de diamètre (Figure 2.3). Le mycélium obtenu à partir du milieu a été séché à 80°C pendant 10 minutes jusqu'au poids constant et pesé. Les résultats obtenus sont reportés en milligramme de matière sèche (mg MS)



Figure 2. 3 : Dispositif de filtration sous vide

II .3- Effet des éléments minéraux sur l'activité cellulase de *Verticillium dahliae* Kleb.

II.3.1- L'activité endo- β -1,4-glucanase

Elle a été mesurée par une augmentation du nombre de groupes réducteurs résultants de la libération de glucose par le CMC en utilisant les réactifs à l'arsénomolybdate de cuivre de Nelson, modifiés par Somogy (Nelson, N. 1944 et Somogy, M. 1952). Le mélange réactionnel contient 1,0ml de CMC à 1,5% dans 0,5ml de tampon acétate (pH 4,8) et 0,5ml d'échantillon. L'absorbance a été déterminée par spectrophotométrie à 540nm. Une courbe étalon de Glucose de concentration allant de 0 à 5 μ M a été établie (**Annexe 3**). L'unité d'activité est définie comme la quantité d'enzyme libérant 1 μ mol /min de sucre réducteur exprimé en équivalent glucose.

II.3.2- L'activité β -1,4 glucosidase

Elle a été déterminée en mesurant le taux de p-nitrophenyle libéré à partir de p-nitrophenil- β -D-glucopyranoside. Le mélange réactionnel standard consistait en 1ml du milieu CzDM (Annexe 1), 1,8ml de tampon acétate 0,1M (pH 4,8) et 0,2ml d'échantillon. Après une incubation de 30 minutes à 50°C, la réaction a été arrêtée avec un tampon à la tricine 0,4M (pH10, 8) et l'absorbance a été déterminée par spectrophotométrie à 420nm. Une courbe étalon de p-nitrophenyle de concentration allant de 0 à 250 μ M a été établie (**Annexe 3**). L'unité d'activité est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1 μ mol/min de p-nitrophényle (Desphande, M. V. et *al.*, 1988)

II .4- Dosage des protéines

La concentration totale en protéines contenu dans les échantillons, est déterminée par la technique mise au point par Bradford (1976). Cette technique utilise du bleu de Coomassie qui a la propriété de s'adsorber sur les protéines de manière non spécifique et indépendamment de leur séquence. Cette adsorption s'accompagne d'une modification du spectre d'absorption de la molécule qui décale vers le bleu.

L'intensité de la coloration sera fonction du nombre de liaisons peptidiques par gramme de protéines et non de la masse molaire de protéines

Le dosage des protéines a été effectué dans une fraction aliquote de l'échantillon (100 μ l). Cette fraction est additionnée à la solution de Bradford (4ml) représentée par sa composition en **Annexe 1**. Le mélange est agité, puis mis au repos pendant 5 minutes pour stabiliser le complexe coloré formé. Ce complexe est la conséquence de la réaction du bleu brillant de Coomassie (BBC) G250 avec les protéines (Figure 2.4). La mesure effective des protéines est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre dans le visible à une longueur d'onde de 595 nm. A cette longueur d'onde le blanc (H₂O distillée) et les échantillons de protéines sont lus alternativement pour s'assurer de l'absence d'interférences liées au solvant eau. Une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de sérum albumine bovine (SAB) (Sigma-Aldrich) pour un domaine de concentration compris entre 0 et 0,8 g/l (**Annexe 3**). À partir de cette courbe d'étalonnage, on détermine systématiquement par extrapolation toutes les solutions inconnues en protéines exprimées en mg ou g/L.

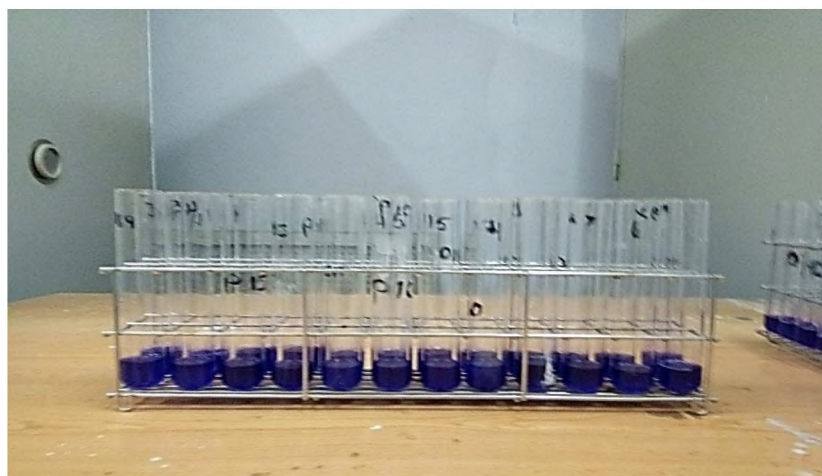


Figure 2. 4 : Formation du complexe coloré entre le bleu brillant de Coomassie et les protéines.

II.5- ANALYSE STATISTIQUE DES DONNÉES

L'analyse statistique des résultats obtenus a été réalisée par le logiciel SPSS© version 20.0.0 pour Windows™. Les expériences ont été répétées sept fois et les résultats montrent les mêmes tendances.

Une analyse de la variance (ANOVA) au seuil de 5% est réalisée pour montrer l'existence de différences statistiquement significatives entre la nature et la concentration en éléments minéraux d'une part et les différents paramètres étudiés (Poids, teneur en Protéines, Activité Glucanase et Glucosidase) d'autre part. Ainsi un test post-hoc de Tukey pour faire ressortir les différents groupes homogènes

Un test de Corrélation (la corrélation de Pearson à 1% et 5%) pour voir l'association entre le poids, la teneur en Protéines, l'activité Glucanase et Glucosidase engendré par les différents traitements.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

III.1- Effet des éléments minéraux sur la croissance mycélienne pondérale de *verticillium dahliae* Kleb

L'influence des différentes doses d'éléments minéraux in vitro sur la croissance pondérale de *Verticillium dahliae* sur milieu Czapeck Dox est illustrée dans la figure 3.1

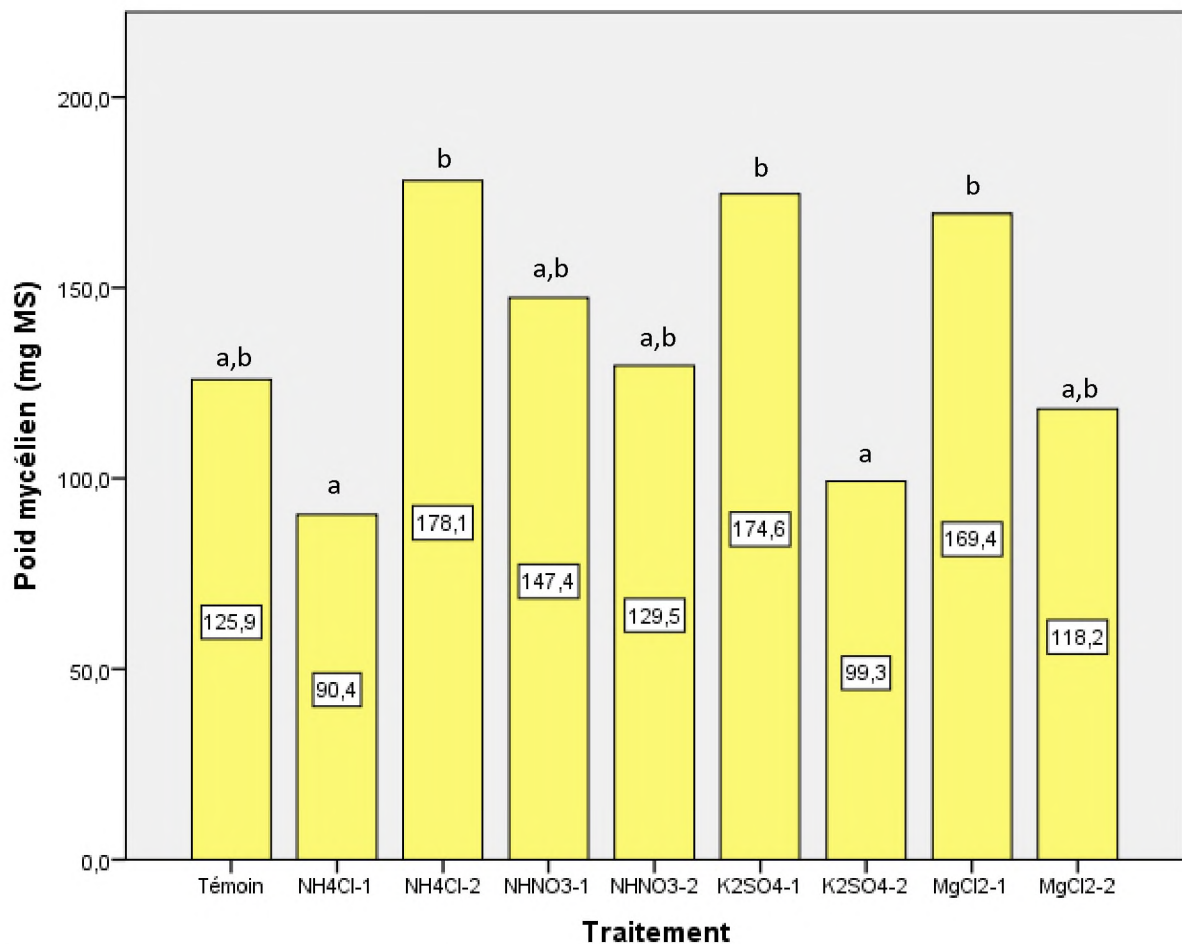


Figure 3. 1 : Effet des éléments minéraux sur la croissance pondérale de *Verticillium dahliae* Kleb

On constate que la croissance pondérale varie selon la source et la dose des éléments minéraux testés, comparé au témoin (*Verticillium dahliae* Kleb dans un milieu Czapek Dox de base) dont la valeur est de (125,9 mg MS).

La plus grande valeur du poids mycélien est observée chez la première source d'azote NH_4Cl à la dose C2 avec une valeur de 178,1mg MS suivie par le potassium K_2SO_4 à la dose C1 (174,6 mg MS).

La plus croissance basse de *Verticillium dahliae* Kleb est observée au niveau des traitements amendés en NH_4Cl (C1) avec une valeur de (90,4mg MS) suivie par le potassium K_2SO_4 (C2) avec une valeur de (99,3mg MS).

On constate que ces deux éléments minéraux ont la plus grande influence sur la variabilité de la croissance pondérale de *Verticillium dahliae*. Plus la concentration en NH_4Cl augmente, plus la croissance pondérale augmente. Contrairement au K_2SO_4 plus sa concentration augmente et plus la croissance pondérale diminue.

L'analyse de la variance (ANOVA) indique la présence de deux groupes homogènes dont le premier renferme le poids mycélien pour le NH_4Cl (Dose C1) et le K_2SO_4 (Dose C2) et le second regroupe le poids pour le NH_4Cl (Dose C2) et le K_2SO_4 (Dose C1) (**Annexe 2**)

Le chlorure de magnésium à la dose C1 occupe la place de la 3eme plus grande valeur concernant la croissance pondérale avec 166,4 mg MS et la 3eme plus faible valeur pour la dose C2 (118,2mg MS).

Les taux de croissance pondérale de la deuxième source d'azote utilisée NH_4NO_3 sont les deux moyennement élevées avec des valeurs de 147,4 mg MS pour la dose C1 et 129,5 mg MS pour la dose C2.

Le même test statistique (ANOVA) indique que l'effet de MgCl_2 (Dose C1); K_2SO_4 (Dose C1) et NH_4Cl (Dose C2) est stimulant pour la croissance pondérale de *Verticillium dahliae* ; ainsi le test de Tukey les regroupe dans le même sous-ensemble homogène (**Annexe 2**)

III.2-Effet des éléments minéraux sur l'activité endo- β -1,4-glucanase et β -1,4-glucosidase

L'activité endo- β -1,4-Glucanase est présentée dans la figure 3.2. Les valeurs varient selon les sources et les concentrations des éléments minéraux, comparés au témoin (0,112 μ M glucose/min/gMS) qui enregistre un taux très faible face à celui de l'azote et du potassium

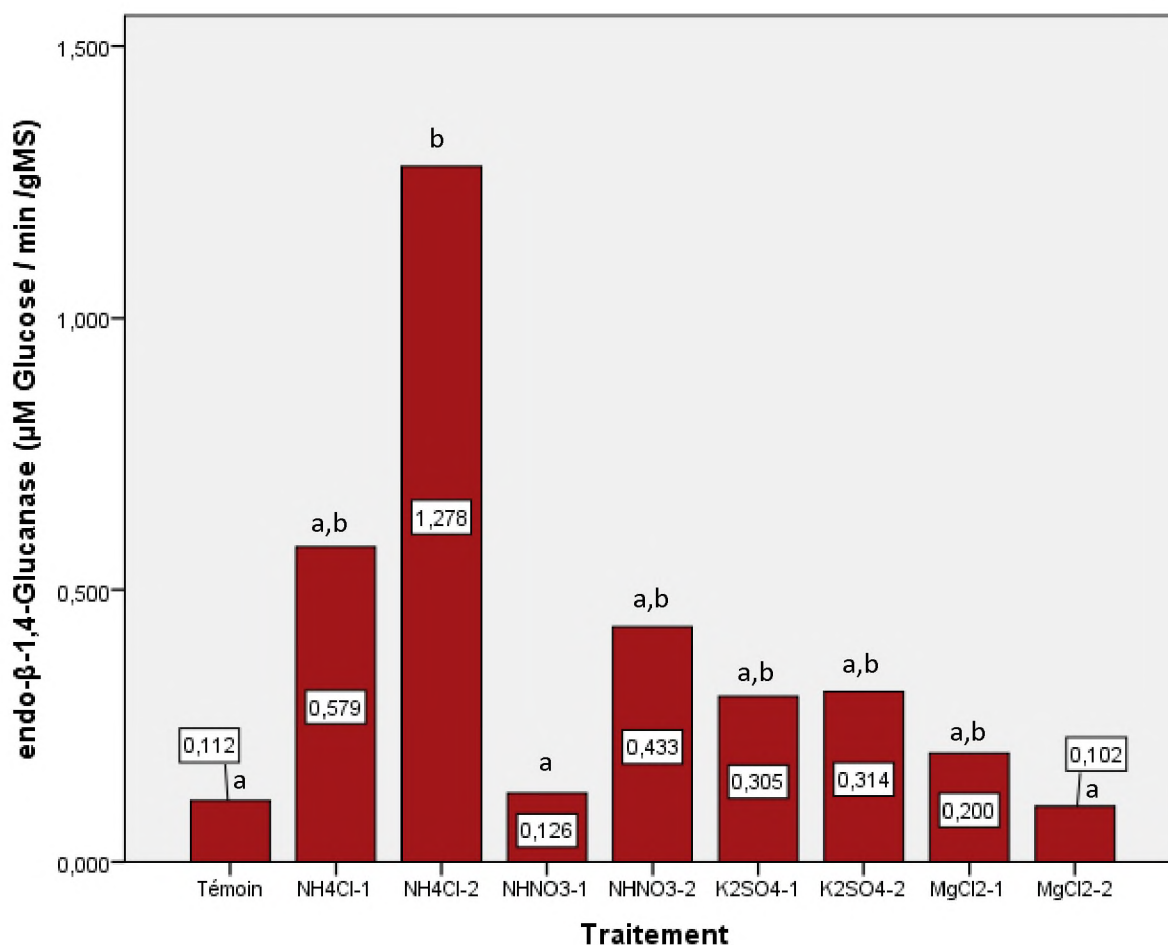


Figure 3. 2 : Effet des éléments minéraux sur l'activité endo- β -1,4-Glucanase du *Verticillium dahliae* Kleb

L'activité la plus élevée est observée chez la première source d'azote NH₄Cl (Dose C2) avec une valeur de 1,278 μ M glucose/min/g MS suivie par le NH₄Cl (Dose C1) avec une valeur de 0,579 μ M glucose/min/g MS, on constate donc que la plus grande activité endo- β -1,4-glucanase est produite par le même élément minéral a des concentrations différentes du fait que l'analyse de la variance ANOVA indique que la 2eme dose en NH₄Cl (qui est la plus élevée) engendre une activité

enzymatique statistiquement différente de celle du témoin d'où leur appartenance à deux groupes différents (**Annexe 2**).

La plus faible valeur de l'activité de l'enzyme Glucanase est observée chez le milieu additionné en magnésium $MgCl_2$ (Dose C2) avec une valeur de $0,102 \mu M$ glucose/min/gMS suivie par NH_4NO_3 (Dose C1) ($0,126 \mu M$ glucose/min/gMS) c'est deux dernier appartiennent au même groupe homogène avec le témoin (**Annexe 2**)

En ce qui concerne le potassium la valeur de l'activité endo- β -1,4-glucanase est presque identique pour les deux concentrations (C1) et (C2) d'où leurs appartenance au même groupe homogène (**Annexe 2**)

On remarque que plus la concentration des éléments minéraux est élevée plus l'activité enzymatique augmente, sauf pour le magnésium.

L'activité β -1,4-Glucosidase est présentée dans la figure 3.3. avec une variation des concentration des éléments minéraux dans un milieu Czapek Dox, toutes les valeurs sont importantes y compris celle du témoin. Le taux le plus élevé est observé chez le potassium (Dose C1) et le magnésium (Dose C1) et les taux les plus bas sont observées chez les deux sources d'azote NH_4Cl (Dose C2) et NH_4NO_3 (Dose C1).

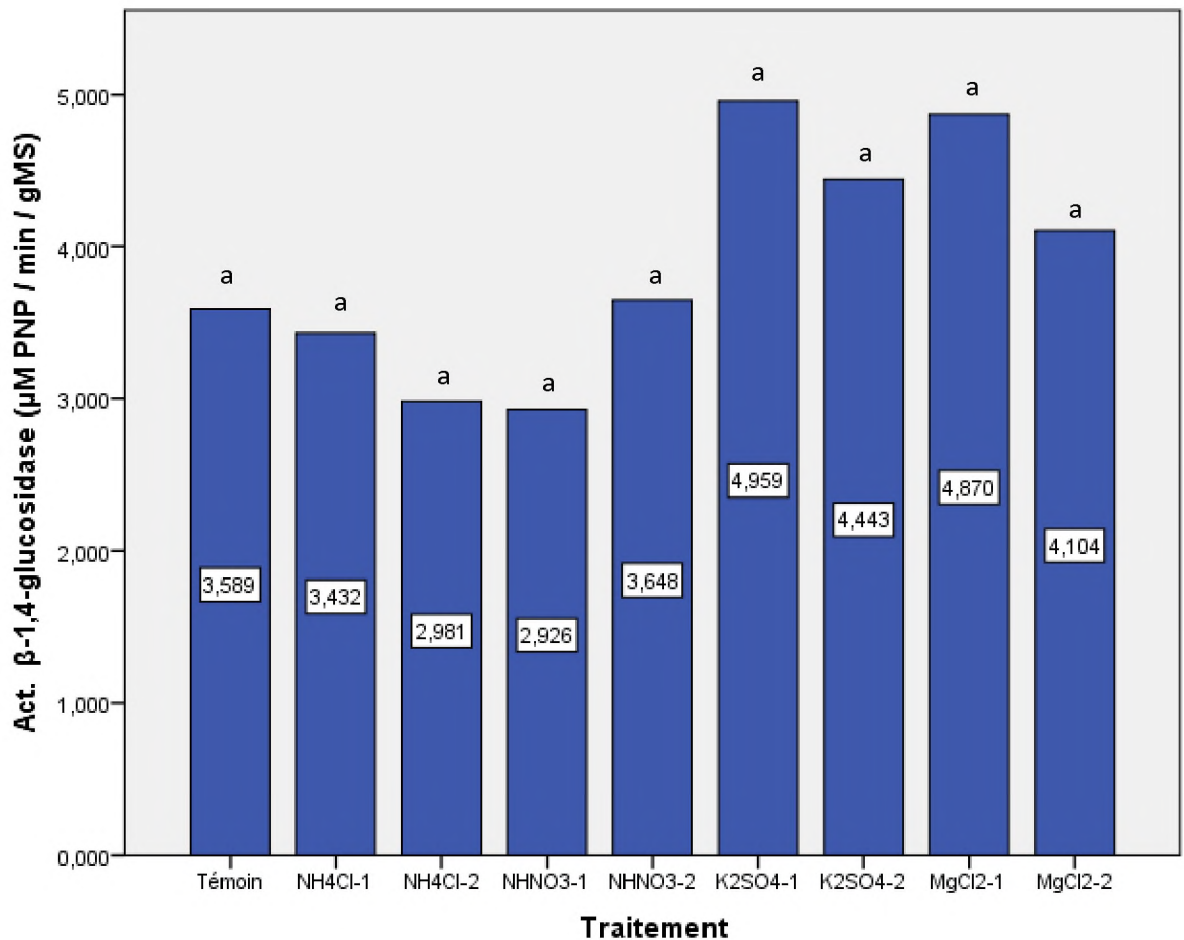


Figure 3. 3 : Effet des éléments minéraux sur l'activité β -1,4 glucosidase du *Verticillium dahliae*

Cette activité est comprise entre 2,926 et 4,959 $\mu\text{M PNP}/\text{min}/\text{gMS}$) dont la valeur du témoin (3,589 $\mu\text{M PNP}/\text{min}/\text{gMS}$)

On remarque que l'augmentation des concentrations chez NH₄Cl, K₂SO₄ et MgCl₂ réduit l'activité enzymatique, contrairement au NH₄NO₃.

L'analyse de la variance au seuil de 5% indique que la variation du milieu de culture en élément minéraux en fonction des doses n'influence pas sur l'activité de la β -1,4 glucosidase du *Verticillium dahliae*

III.3- Effet des éléments minéraux sur la teneur en protéines

La figure 3.4 montre l'effet des éléments minéraux sur la teneur en protéines (g /g MS) les résultats varient entre 0,033 et 0,094 g/g MS selon la concentration et la source des éléments minéraux, le taux le plus élevés est noté chez l'azote (NH_4NO_3) au niveau des deux concentrations (Dose C1) et (Dose C2). Le taux le plus faible de teneur en protéines est observé chez le magnésium MgCl_2 (Dose C2) et le potassium K_2SO_4 (Dose C1).

L'analyse de la variance fait ressortir que les teneurs en protéine engendrée par les deux doses en NH_4NO_3 sont statistiquement différents de ceux du MgCl_2 (Dose C2) et le potassium K_2SO_4 (Dose C1). (**Annexe 2**)

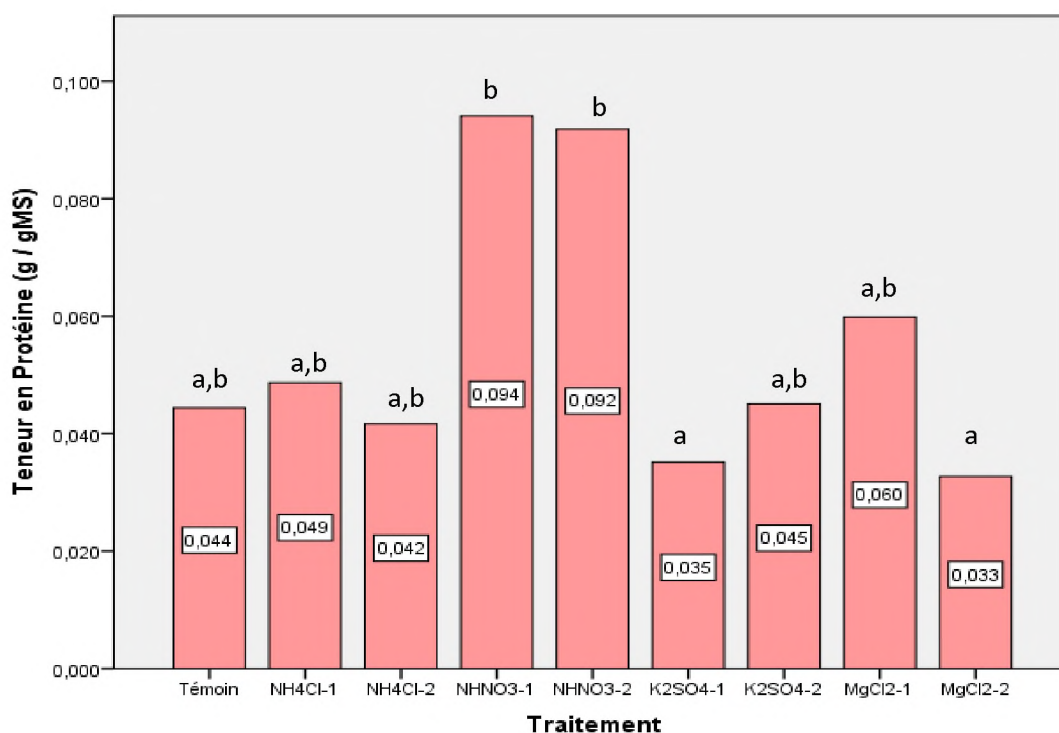


Figure 3. 4: Effet des éléments minéraux sur la Teneur du milieu en protéines en fonction

III.4- Effet des éléments minéraux sur la corrélation des paramètres étudiés

La corrélation est une quantification de la relation linéaire entre des variables continues. Le calcul du coefficient de corrélation de Pearson repose sur le calcul de la covariance entre deux variables continues. Le coefficient de corrélation est en fait la standardisation de la covariance. Cette standardisation permet d'obtenir une valeur qui variera toujours entre -1 et +1, peu importe l'échelle de mesure des variables mises en relation. Les tableaux des corrélations dont la synthèse des résultats cités ci-dessous sont consignés en Annexe 2

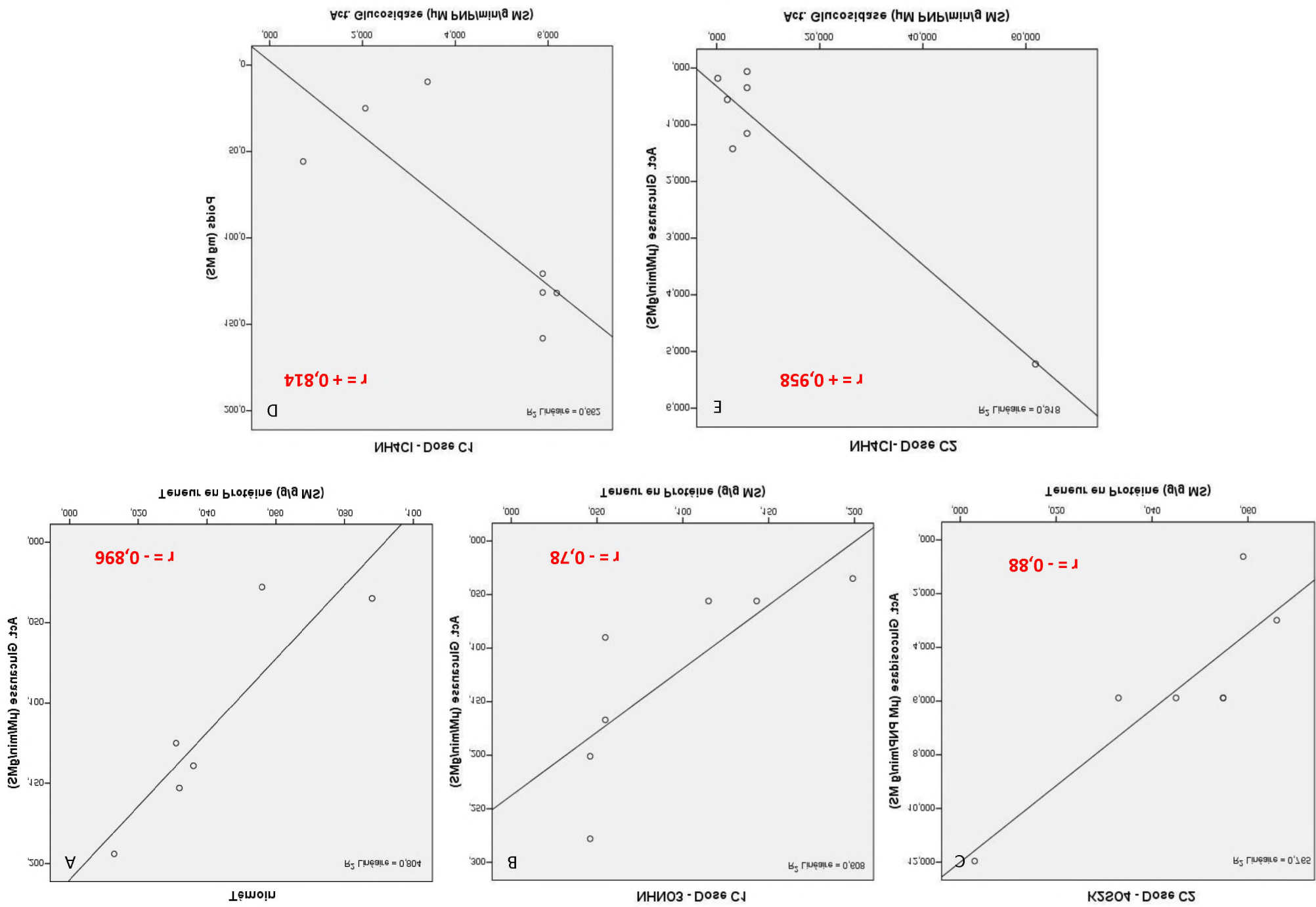
Dans les conditions standards de l'expérimentation (Témoin) nous observons l'existence d'une corrélation uniquement entre la teneur en protéine et l'activité Glucanase (Figure 3.5 A). Cette corrélation est inversement proportionnelle et de **très forte** intensité ($r = -0,896$).

L'addition de l'azote sous forme de nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) avec une dose de 0,33 g/L (Dose C1) affaiblie la corrélation entre la teneur en protéine et l'activité Glucanase (Figure 3.5 B) par rapport à ce qui est observé chez le témoin. La corrélation garde son sens (corrélation inversement proportionnelle) mais devient de **forte** intensité ($r = -0,78$)

Avec l'ajout de 7,11 g/L (Dose C2) de sulfate de potassium (K_2SO_4), nous notons l'apparition d'une nouvelle corrélation inversement proportionnelle et de **très forte** intensité ($r = -0,88$) entre la teneur en protéine et l'activité Glucosidase (Figure 3.5 C).

Le chlorure d'ammonium engendre une corrélation mettant en jeu l'activité Glucosidase. En effet à une dose de 0,33 g/L (Dose C1) de NH_4Cl on note une corrélation proportionnelle de **très forte** intensité entre l'activité Glucosidase et le Poids de *Verticillium dahliae* ($r = +0,814$) (Figure 7.5 D). À la dose C2 (3,5 g/L) on relève une autre corrélation entre l'activité Glucanase et l'activité Glucosidase qui est également proportionnelle de très forte intensité **presque parfaite** ($r = +0,958$) (Figure 3.5 E)

Figure 3.5 : Effet des éléments minéraux sur la Corrélation entre les paramètres étudiés



DISCUSSION

Les éléments minéraux sont essentiels à la croissance et au développement des Champignons (Nyiransengiyumva, 2007) et peuvent avoir aussi des effets néfastes sur le développement de certaines maladies fongiques.

L'impact des éléments minéraux sur la croissance pondérale et l'activité enzymatique *in vitro* du *Verticillium dahliae* a été étudié dans ce travail.

L'apport d'azote sous forme de nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) au milieu de culture liquide Czapek-dox augmente significativement la croissance pondérale du verticillium.

L'apport d'azote sous forme de chlorure d'ammonium, diminue la croissance pondérale du verticillium.

L'azote a été intensivement étudié dans la relation "nutrition de l'hôte-sévérité de la maladie" depuis plusieurs années (Huber et Watson, 1974). L'azote présente différents effets selon la culture et l'agent pathogène étudié.

D'après les recherches de (huber et watson, 1974), l'azote sous forme de nitrate augmente le développement du verticillium et sous forme d'ammonium le diminue.

Nam et al. (2006) ont montré que des concentrations élevées d'azote dans la solution nutritive ont augmenté la sévérité de l'antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) chez une culture de fraisier en système hydroponique fermé.

La plupart des champignons peuvent utiliser les nitrates comme source d'azote. La seule voie du métabolisme d'assimilation de l'azote sous forme des nitrates est leur réduction en nitrites en présence de l'enzyme nitrate réductase, suivie d'une réduction en ammonium (Deacon, 2006). Certains groupes de champignons comme les basidiomycètes sont incapables d'utiliser les nitrates comme source d'azote puisqu'ils sont incapables de synthétiser la nitrate réductase (Whitaker, 1976). Ceci ne semble pas être le cas de verticillium qui croît relativement bien sur un milieu contenant des nitrates (nitrates d'ammonium) (NH_4NO_3).

Davis et al.,(1986) constatent également que la sévérité et l'incidence de la maladie de la verticilliose sur pomme de terre est en corrélation négative avec la fertilisation azotée sous forme de chlorure d'ammonium.

Nos résultats suggèrent que la fertilisation azotée sous forme de chlorure d'ammonium pourrait contribuer à la diminution de la sévérité du *Verticillium dahliae* (agent du flétrissement des cultures maraichères).

L'effet du potassium sur le développement ou la croissance pondérale du verticillium varie selon la concentration du K₂SO₄.

IMRANI et al.,(2014) stipulent qu'en générale, l'excès de potassium augmente la croissance mycélienne et la sporulation de *Helminthosporium sativum* et *Helminthosporium australiensis*, donc un meilleur développement des pathogènes est accompagné d'un autre niveau en potassium, ce constat est confirmé par Hervieux (2002) qui a noté une stimulation de la croissance mycélienne d'*Helminthosporium solani*, suite à un apport élevé de chlorure de potassium (KCl) sur le milieu PDA.

L'augmentation de concentration en sulfate de magnésium diminue la croissance pondérale du verticillium.

NYIRANSENGIYUMVA 2007 rapporte que Le magnésium sous Forme de MgSO₄-7H₂O diminue le nombre de conidies viables à des concentrations supérieures à 5ppm sans toutefois affecter la croissance mycélienne et la production totale de conidies *Helminthosporium solani*. Tout comme les travaux de Wisniewski et al.(1995) montrant que le chlorure de Magnésium (25-175mM) n'a pas d'effet significatif sur la croissance du tube germinatif de *Botrytis cinerea* et de *Penicillium expansum*.

De nombreux champignons phytopathogènes sont connus pour leur production d'enzymes capables de dégrader les polysaccharides des parois cellulaires de leurs plantes hôtes. Les cellulases et les pectinases seraient impliquées dans les maladies des plantes et dans le processus de la dégradation des tissus durant la colonisation par l'agent pathogène (Wood, 1960 ; Cooper & Wood, 1975). *Verticillium albo-atrum* produit une gamme de polysaccharidases qui dégradent les parois cellulaires des tissus vasculaires de la tomate (Cooper et al ; 1978 ; Cooper & Wood, 1980 ; Durand

& Cooper, 1988). Une augmentation de l'activité endopectine lyase dans les vaisseaux conducteurs des tomates sensibles a été enregistrée trois jours après l'infection par *V. albo-atrum* et bien avant l'apparition de symptômes (Cooper & Wood, 1980).

Dans le processus de pénétration des champignons pathogènes à travers la paroi cellulaire, un rôle essentiel est également joué par les enzymes hydrolysant les hémicelluloses et les celluloses. En effet, Russel, (1975) a montré que l'infection des tomates avec *V. albo-atrum* entraîne une augmentation de l'activité cellulolytique aussi bien chez les plantes sensibles que résistantes. Cet auteur stipule que les cellulases sont produites par les plantes mais aussi en grande partie par le pathogène. Les références aux enzymes consultés concernent principalement des études in vitro sur l'organisme; Cependant, de nombreux articles font référence à des études in vitro et in planta ou à une partie subordonnée d'une étude différente. Pour ces raisons, les enzymes sont également abordées dans les chapitres sur la pathogenèse, la résistance, la morphologie, la taxonomie et ailleurs. La littérature abondante sur les enzymes pectolytiques et cellulolytiques a principalement été examinée dans les volets de pathogenèse. Des revues détaillées ont également été présentées par Dimond (1955, 1970), Pegg (1981, 1985), Beckman (1987), Heale (1988) et Bell (1992). Plusieurs auteurs écrivant dans les années et 1990 sur les enzymes semblent ignorer l'importance de la composition et de la concentration du substrat, d'où le problème de l'induction enzymatique et de la répression des substrats et des produits, examiné dans le document de base de Cooper et Wood (1975).

Les enzymes concernées par la dégradation de substrats autres que les substances à base de pectine et de cellulose incluent diversement la galactanase, la xylanase, l'arabinase, la glucosidase, la glucanase, la chitinase et la protéase. Keen et al. (1970) ont décrit l'induction et la répression de la D-galactosidase à partir de cultures de *V. albo-atrum*.

V. albo-atrum possède au moins deux galactanases, une exo-xylanase et une endo-arabinase (Cooper et Wood, 1975). Mussell et Strouse (1971) ont montré que *V. dahliae* sécrétait des protéases extracellulaires capables d'hydrolyser les protéines lorsqu'elles étaient utilisées comme source unique de carbone. Vessey et

Pegg (1973) et Young et Pegg (1982) ont décrit l'endo-chitinase, la 1,4-acétylglucosaminidase, la 1,4-glucosidase et l'exo-1,3-glucanase chez *V. albo-atrum*. L'hydrolyse des préparations de parois de cellules de *V. albo-atrum* purifiées était complexe et faisait intervenir une combinaison d'enzymes hôte (tomate) et fongique (Young et Pegg, 1982). Adylbekov et al. (1991) ont caractérisé une 1,3 -glucanase de *V. dahliae* présente dans des filtrats de culture et du mycélium. Il a été affirmé que l'enzyme purifiée pourrait hydrolyser les polysaccharides de la paroi cellulaire de *V. dahliae*. Bahkali (1991) a confirmé les résultats de Cooper et Wood (1975) relatifs à la xylanase et montré que la synthèse de glucose et de xylose réprimait la xylanase, tandis que la cellulose, la cellobiose et la carboxyméthylcellulose induisaient une certaine stimulation enzymatique. Dans une comparaison entre *V. albo-atrum*, *V. dahliae*, *V. tricornis*, *V. nubilum* et *V. nigrescens*, *V. dahliae* présentait les taux les plus élevés d'enzymes cellulolytiques et la plus grande pathogénicité pour la tomate (Bahkali, 1989a). Bahkali (1989) a décrit l'induction de l'endo-PG, de l'exo- PG et du PL dans des cultures de *V. tricornis* isolées à partir de plants de pomme de terre fanés. Bahkali (1987) a décrit un résultat similaire sur des parois cellulaires isolées de palmiers dattiers (*Phoenix dactylifera*).

La production de PL uniquement était proportionnelle au taux de croissance du mycélium. Les faibles concentrations de substrat enzymatique améliorent la synthèse enzymatique (Cooper et Wood, 1975). À l'inverse, de fortes concentrations de produit ou de substrat répriment la synthèse (Talboys et Busch, 1970). Le glucose, une source de carbone commune du milieu, inhibe la plupart des polysaccharases à sa concentration en éléments nutritifs (Talboys, 1958a; Keen et Erwin, 1971; Selvaraj, 1974). Le saccharose, le lactose et le galactose agissent comme des répresseurs similaires (Talboys, 1958; Bell et al., 1971; Cooper et Wood, 1975). Les autres facteurs influençant l'activité enzymatique chez les espèces de *Verticillium* sont: le tissu hôte (Bell et al., 1971; Cooper et Wood, 1975), la source d'azote, par ex. peptone (Talboys et Busch, 1970), ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} (Talboys et Busch, 1970; Bell et al., 1971; Mussell et Strouse, 1972; Selvaraj, 1974), pH (Cooper et Wood, 1975) et l'agitation de milieux aqueux (Keen et Erwin, 1971). Alors que la plupart des enzymes concernées par le métabolisme basique sont constitutives, de nombreuses enzymes extracellulaires (sécrétoires) sont induites par des substrats spécifiques.

La production des polysaccharidases par les champignons dépend de la nature de la source de carbone du milieu (Gupta & Heale, 1971 ; Bahkali, 1995). Les études menées in vitro par Gupta & Heale, (1971) ont montré que parmi le grand nombre de sucres et de polysaccharides, seul les substrats à base de cellulose et de cellobiose peuvent induire la production de cellulases. Selon le même auteur, l'activité cellulase peut être convenablement étudiée en utilisant plusieurs formes de cellulose soluble et incluant les sels de Na⁺ du carboxyméthylcellulose comme substrat.

Bateman, (1969) a rapporté que l'environnement où se développent certains champignons phytopathogènes influe sur le type et la quantité d'enzymes pectocellulosiques qu'ils produisent.

Lors d'essais avec quatre isolats de la souche 'Bukhara' de *Verticillium dahliae*, les activités de la catalase et de l'invertase ont diminué dans le mycélium avec l'âge mais ont augmenté dans le milieu de culture. L'ajout de sels de P ou de S au milieu et la substitution de NaNO₃ par NH₄NO₃ ou CO(NH₂)₂ ont considérablement réduit la catalase mais ont légèrement augmenté les activités d'invertase.

Les travaux de Novo M. et al. (2006) indiquent que des isolats de *Verticillium dahliae*. ont produit des cellulases capables de dégrader la cellulose soluble et cristalline afin d'établir qu'ils possèdent les trois activités enzymatiques nécessaires à l'hydrolyse de la cellulose (Cooper. 1984). Les isolats se comportaient de la même manière en présence de cellulose soluble et tous deux étaient capables de la dégrader. Cependant, l'isolat le plus agressif avait une plus grande activité de β -1,4-glucosidase et d'endo- β -1,4-glucanase (Novo M. et al. 2006).

Les cellulases peuvent ne pas être le facteur déterminant de l'agressivité et, par conséquent, la cause des symptômes; Cependant, ils peuvent jouer un rôle important dans le processus de pénétration (Walton.J.D. 1994).

Les champignons du genre *Verticillium* sont des parasites vasculaires qui vivent et se reproduisent à l'intérieur des vaisseaux du xylème de leurs plantes hôtes. Ils sont donc soumis aux fluctuations de la composition chimique de la sève elle-même dépendante des variabilités du milieu nutritif extérieur.

L'excrétion des protéines par *Verticillium* est influencée par la nature de la substance carbonée ou de la présence de substances de croissance (Chaib, 1987).

Les quantités de protéines extracellulaires sont corrélées avec la virulence du champignon. En effet, Chaib, (1987), a montré des différences dans les taux de protéines secrétées par des isolats de *Verticillium albo-atrum* selon leur pouvoir pathogène vis-à-vis de la tomate. Les souches pathogènes produisant 10 fois plus de protéines que les souches non pathogènes. Des résultats similaires ont été décrits par Saksirirat & Hoppe (1991). Ces auteurs ont rapporté des différences dans les niveaux des protéines synthétisées in vitro par *Verticillium lecanii* et *Verticillium psallioetea*.

Dans notre étude, toutes les enzymes étaient principalement extracellulaires. Ce système enzymatique permet à *V. dahliae* de se développer dans des milieux où la cellulose est une source de carbone et peut contribuer à la dégradation de la paroi cellulaire, ce qui est très important pour la pénétration de l'hôte **(De Lorenzo et al. 1997 , Pegg et al. 1985)**

Chez *V. albo-atrum*, les isolats haploïdes hautement pathogènes pour le coton avaient 10 fois plus d'activité β -1,4-glucosidase que les diploïdes moins pathogènes **(Howel et al. 1970)**. Chez le pathogène nécrotrophe de la carotte, *Mycocentrospora acerina*, l'activité de l'endo- β -1,4-glucanase était plus élevée chez les isolats les plus agressifs **(Le Cam et al. 1994)**. Le comportement de ces isolats était différent lorsque l'on tentait de dégrader une source de cellulose cristalline, car l'isolat le plus agressif sécrétait l'enzyme dans le milieu de culture plus tôt que l'isolat moins agressif. Le fait que l'isolat moins agressif ait besoin de plus de temps pour se dégrader peut être important pour la pathogénèse, car une réduction de l'activité sur la cellulose native pourrait suggérer que le champignon a une capacité diminuée à coloniser l'hôte, ce qui retarde l'apparition des symptômes et une expression plus douce de la maladie. Ces résultats peuvent suggérer que *V. dahliae* produit les cellulases nécessaires pour contribuer à la dégradation des parois des cellules du poivron. De plus, le taux et l'ampleur de la synthèse des cellulases devraient jouer un rôle important dans l'agressivité de *V. dahlia* puisqu'il a été établi auparavant pour des interactions dans plusieurs situations pathogènes **(Barkai-Golan et al. 1991)**.

Les cellulases peuvent ne pas être le facteur déterminant de l'agressivité et, par conséquent, la cause des symptômes; Cependant, ils peuvent jouer un rôle important dans le processus de pénétration **(Walton et al. 1994)**. Les bactéries

cellulases ont été corrélées à l'agressivité puisque des mutants induits de *Clavibacter michiganensis* ne possédant pas le plasmide pCS1 contenant le gène de la cellulase étaient avirulents. L'activité de la cellulase, associée à d'autres enzymes ou à la synthèse de toxines par l'agent pathogène, peut être responsable de l'agressivité de l'agent pathogène. Les phytopathologistes ont généralement estimé que les cellulases ne sont pas particulièrement importantes dans la pathogenèse, car une dégradation importante de la cellulose ne se produit généralement que tardivement, voire pas du tout (**Cooper et al. 1984**); cependant, lorsque les principaux gènes d'endoglucanase des bactéries phytopathogènes *Pseudomonas solanacearum* et *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ont été perturbés, la virulence a diminué (**Gough et al. 1988, Roberts et al. 1988**). Bien que la relation entre les enzymes et la pathogénicité n'ait pas été établie à ce jour, ils sont considérés comme des facteurs d'agression possibles car la colonisation de l'hôte et sa survie peuvent dépendre de la capacité de l'agent pathogène à dégrader les composants de la paroi cellulaire (**De Lorenzo et al. 1997**). Des études sur des mutants de *V. dahliae* déficients en cellulases pourraient aider à déterminer l'importance de ces enzymes dans l'infection et donc toute relation avec l'agressivité de l'agent pathogène

CONCLUSION

Ce travail s'inscrit dans un programme de recherche destiné à mieux comprendre les mécanismes d'action du *Verticillium dahliae* (agent redoutable des cultures maraichères), afin d'évaluer des moyens de lutte efficaces contre ce champignon. On avait pour objectif d'évaluer in vitro l'effet des différentes sources et concentrations d'azote, du potassium, magnésium sur la croissance pondérale et l'activité enzymatique de cet agent fongique pathogène.

Les résultats obtenus ont démontré que la source et la concentration d'éléments minéraux comme l'azote, potassium, et magnésium étudiés après 2 semaines d'incubation du *Verticillium dahliae* sur milieu Czapek-dox influencent sa croissance pondérale et son activité enzymatique.

On a constaté que l'azote sous forme de chlorure d'ammonium NH_4Cl à une concentration de 0,33 g/L diminue la croissance pondérale du *Verticillium dahliae*, Contrairement aux nitrates d'ammonium (NH_4NO_3), qui, à la même concentration stimule la croissance pondérale du champignon. Des concentrations élevées de potassium sous forme de sulfates (7,11 g/L) et de magnésium (chlorure de magnésium) (1g/L) diminue la croissance pondérale du *Verticillium dahliae*.

En ce qui concerne l'effet de ces éléments minéraux sur l'activité enzymatique du *Verticillium dahliae*, on remarque que l'augmentation des concentrations en magnésium diminue l'activité endo- β -1,4-glucanase et l'augmentation des concentrations du chlorure d'ammonium (NH_4Cl) diminue l'activité β -1,4-glucosidase.

On conclue donc que les éléments minéraux peuvent avoir un effet inhibiteur, et/ou un effet accélérateur sur le développement et l'activité enzymatique du *Verticillium dahliae*

Dans les travaux futurs, il serait intéressant de faire une étude plus approfondie en utilisant d'autres concentrations sélectionnées, d'autres isolats, et de tester d'autres sources des éléments minéraux.

Ainsi, les informations qui en découleront et celles obtenues in vitro pourront éventuellement servir pour élaborer des plans stratégiques de fertilisation ou de

modification des propriétés telluriques afin de mieux contrôler le développement de cette maladie. Ainsi la source NH_4Cl avec son fort effet inhibiteur à concentration élevée peut être un facteur important pour le contrôle de cette maladie

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **AGRIOS N.G., 1988.** PLANT DISEASE EPIDEMIOLOGY. IN PLANT PATHOLOGY, ACADEMIC PRESS, INC. 3TH EDITION, 156-179.
- **AGROELEVAGE, 2011.** GÉNÉRALITÉS SUR LES CULTURES MARAÎCHÈRES ET LES CULTURES LÉGUMIÈRES.
- **ALFANO G., LUSTRATO G., LIMA G., VITULLO D., RANALLI G. 2011.** CHARACTERIZATION OF COMPOSTED OLIVE MILL WASTES TO PREDICT POTENTIAL PLANT DISEASE SUPPRESSIVENESS. BIOL. CONTROL., 58:199-207.
- **ARSLAN M., DERSIS S. 2010.** ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AGAINST THREE VEGETATIVE COMPATIBILITY GROUPS OF VERTICILLIUM DAHLIAE. WORLD J. MICROBIOL. BIOTECHNOL., 26:1813–1821.
- **BAHKALI A.H., 1995.** PRODUCTION OF CELLULASE, XYLANASE AND POLYGALACTURONASE BY VERTICILLIUM TRICORPUS ON DIFFERENT SUBSTRATES. BIORESOURCE TECHNOLOGY 51(2-3): 171-174.
- **BALANDINA I.D., SHVETSOVA L.P. AND MIRYAKUBOVA M., 1976.** ROLE OF CERTAIN ENZYMES OF VERTICILLIUM DAHLIAE IN PATHOGENESIS OF VERTICILLIUM WILT OF COTTON. FIZIOL. RAST., 23:155-159.
- **BARKAI-GOLAN, R., AND KARADAVID, R. 1991.** CELLULOLYTIC ACTIVITY OF PENICILLIUM DIGITATUM AND P. ITALICUM RELATED TO FUNGAL GROWTH AND TO PATHOGENESIS IN CITRUS FRUITS. J. PHYTOPATHOL. 131:65-72.
- **BATEMAN D.F., 1969.** SOME CHARACTERISTICS OF THE CELLULASE SYSTEM PRODUCED BY SCLEROTIUM ROLSFII SACC. PHYTOPATHOLOGY 59: 37-42.
- **BELLAHCEN M., 2004.** LA VERTICILLIOSE DE L'OLIVIER : ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE ET DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE VERTICILLIUM DAHLIAE KLEB., AGENT DE LA VERTICILLIOSE. THÈSE DE DOCTORAT D'ÉTAT DE SCIENCE, UNIVERSITÉ D'ORAN, ALGÉRIE. 145 P.

- **BELLAHCEN, M., FORTAS, Z., GEIGER, J.P., MATALLAH, A., HENNI, D., 2000.** VERTICILLIUM WILT IN OLIVE IN ALGERIA : GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION AND EXTENT OF THE DISEASE. OLIVAE, 82, PP.41-43.
- **BERLANGER, I. AND POWELSON, M.L. (2000).**VERTICILLIUM WILT
- **BLANCARD DOMINIQUE, 2013** VERTICILLIUM DAHLIA KLEB, (1913)
VERTICILLIUM ALBO-ATRUM REINKE È BRETHOLD
- **BOTTON B., BRETON A., FÉVRE M. GAUTHIER S., GUY PH., LARPENT J-P., REYMOND P., SANGLIER J-J., VAYSSIER Y. AND VEAU R. (1990).**
MOISSISSURES UTILES ET NUISIBLES : IMPORTANCE INDUSTRIELLE.
ÉDITION MASSON, PARIS.
- **BOUKENADEL F. 2001.** CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE VERTICILLIUM DAHLIAE KLEB., AGENT DE LA VERTICILLIOSE DE L'OLIVIER. MÉM. MAGISTER, UNIV. TLEMCEN (ALGÉRIE),103P.
- **BRADFORD, M. M. 1976.** A RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR THE QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING THE PRINCIPLE OF PROTEINDYE BINDING. ANAL. BIOCHEM. 72:248-254.
- **C. GALINET 1987.** LA VERTICILLIOSE DE LA TOMATE.
- **COOPER, R. M. 1984.** THE ROLE OF CELL WALL DEGRADING ENZYMES IN INFECTION AND DAMAGE.
- **D. BLANCARD.(2014)**VERTICILLIUM DAHLIA KLEB.
- **DE LORENZO, G., CASTORIA, R., AND CERVONE, F. 1997.** FUNGAL INVASION ENZYMES AND THEIR INHIBITION. PAGES 61-83 IN: THE MYCOTA. PLANT RELATIONSHIPS, PART A VOL. 5. K. ESSER AND P. A. LEMKE, EDS. SPRINGER-VERLAG, BERLIN.
- **DEACON, J.W., 2006.** FUNGAL BIOLOGY. 4TH EDITION. INSTITUTE OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, UNIVERSITY OF EDINBURGH, BLACKWELL PUBLISHING, U.K., 371 PAGES.
- **DUFFY, B.K. ET DÉFAGO, G., 1999.** MACRO-AND MICROELEMENTS FERTILIZERS INFLUENCE THE SEVERITY OF FUSARIUM CROWN AND ROOT ROT OF TOMATO IN A SOILLESS PRODUCTION SYSTEM. HORT.SCI.34:287-291.
- **EL AISSAMI A., BRHADA F. ET LAHLOU H., 1998.** EFFET DE L'ADAPTATION PROGRESSIVE À LA LUZERNE D'UN ISOLAT DE

VERTICILLIUM DAHLIAE (D'ORIGINE TOMATE) SUR LA SYNTHÈSE IN VITRO DE SES ENZYMES PECTOCELLULYTIQUES. CRYPTOLOGAMIE, MYCOL. 19 (3) 227-234.

- **EL-ABYAD M.S., AMIRA M., ABU-TALEB AND MARY S. KHALIL., 1992.** IMPACT OF SALINITY STRESS ON SOIL-BORNE FUNGI OF SUGARBEET. III. PLANT CELL WALL-DEGRADING ENZYMES BY RHIZOCTONIA SOLANI KÜHN AND SCLEROTIUM ROLFSII SACC. IN VITRO AND IN VIVO. PLANT AND SOIL 143: 75-83.
- **ENGELHARD, A.W.,1989** RED. APS PRESS, THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, ST. PAUL, MN, PP18-32.
- **FINE MEDIA 2007-2016.** LES 7 ENGAGEMENTS DES EXPERTS DEVENIR EXPERT OOREKA.
- **FRADIN, E.F. AND THOMMA, B.P.H.J. (2006).** PHYSIOLOGY AND MOLECULAR ASPECTS OF VERTICILLIUM WILT FRADIN, E.F. AND THOMMA, B.P.H.J. DISEASES CAUSED BY V. DAHLIAE AND V. ALBO-ATRUM. MOL. PLANT PATHOL. 7: 71–86.
- **FRAVEL, D.R., DAVIS, J.R. AND SORENSEN, L.H. (1986)** EFFECT OF TALAROMYCES FLAVUS AND METHAM ON VERTICILLIUM WILT INCIDENCE AND POTATO YIELD 1984–1985. BIOLOGICAL CULTURE TESTS 1, 17.
- **GAUCHER, D.,1998.** MALADIES DE LA POMME DE TERRE. INSTITUT TECHNIQUE DES CÉRÉALES ET DES FOURRAGES. PARIS, 48 PAGES.
- **GOUGH, C. L., DOW, J. M., BARBER, C. E., AND DANIELS, M. J. 1988.** CLONING OF TWO ENDOGLUCANASE GENES OF XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV CAMPESTRIS: ANALYSIS OF THE ROLE OF THE MAJOR ENDOGLUCANASE IN PATHOGENESIS. MOL. PLANT-MICROBE INTERACT. 1:275-281.
- **HAWKE, M. A., AND LAZAROVITS, G. 1994 :** PRODUCTION AND MANIPULATION OF INDIVIDUAL MICROSCLEROTIA OF VERTICILLIUM DAHLIAE FOR USE IN STUDIES OF SURVIVAL, PHYTOPATHOLOGY 84 :883-890.
- **HENNI J.E. 1982.** CONTRIBUTION À LA LUTTE CONTRE LE VERTICILLIOSE : FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES

INHIBANT LA GERMINATION DESMICOSCLEROTES DE VERTICILLIUM DAHLIAE KLEBAHN. THÈSE.DOCT. D'ETAT. UNIV. PARIS (FRANCE). 150PP.

- **HOFFLAND,E.,JEGER,M.J.ET VAN BEUSICHEM,M.L.,2000.**EFFECT OF NITROGEN SUPPLYRATE ON DISEASE RESISTANCE IN TOMATO DEPENDS ON THE PATHOGEN.PLANTSOIL218:239-247.
- **HOWELL, C. R. 1970.** DIFFERENTIAL ENZYME SYNTHESIS BY HAPLOID AND DIPLOID FORMS OF VERTICILLIUM ALBO-ATRUM. PHYTOPATHOLOGY 60:488-490.
- **HUBER,D.M. ET WATSON,R.D.,1974.**NITROGEN FORM AND PLANT DISEASE. ANNU.REV. PHYTOPATHOL.1 2:139-165.
- **HUBER,D.M.,1978.** DISTURBED MINERAL NUTRITION. DANS PLANT PATHOLOGY, AND ADVANCED TREATISE. VOL. III. HORSFALL, J.G.ET COWLING, E.B., REDS. ACADEMIC PRESS, NEWYORK, NY,PAGES163-181.
- **HUBER,D.M.,1980.**ROLE OF NUTRIENTS IN DEFENSE. DANS PLANT PATHOLOGY,AN ADVANCED TREATISE. VOL.V. HORSFALL, J.G.ET COWLING, E.B., REDS.ACADEMIC PRESS, NEW YORK, NY,PAGES381-406.
- **HUBER,D.M.,1989.**DANS SOILBORNE PLANT PATHOGENS: MANGEMENT OF DISEASES WITH MACRO-AND MICROELEMENTS. ENGELHARD,A.W., RED.APSPRESS, THE AMERICANPHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY,ST.PAUL,MN,PAGES1-8.
IDENTIFICATION OF SOILS SUPPRESSIVE AGAINST HELMINTHOSPORIUMSOLANI, THE CAUSAL AGENT OF POTATO SILVER SCURF .SOILBIOL.BIOCHEM.34:1861-1868P.
- **IMRANI N, CHAHDI OA, CHLIYEH M, TOUATI J, TOUHAMI OA, BENKIRANE R , ET DOUIRA A.2014.**EFFET IN VITRO DE DIFFÉRENTS NIVEAUX NPK SUR LA CROISSANCE MYCÉLIENNE ET LA SPORULATION DE CINQ PATHOGÈNES FOLIAIRES DU RIZ : HELMINTHOSPORIUM SP. ET CURVULARIALUNATA. UNIVERSITÉ IBN TOFAÏL, FACULTÉ DES SCIENCES, LABORATOIRE DE BOTANIQUE ET DE PROTECTION DES PLANTES, B.P. 133, KENITRA, MAROC. PP7250.

- **ISAAC, I. (1967).** SPECIATION IN VERTICILLIUM. ANNU. REV. PHYTOPATHOL. 5 ISAAC, I. 5: 201– 222.
- **J. BEJARANO-ALCÁZAR,¹ A.J. TERMORSHUIZEN² AND R.M. JIMÉNEZ-DÍAZ , (1999),** SINGLE-SITE ROOT INOCULATIONS ON EGGPLANT WITH MICROSCLEROTIA OF VERTICILLIUM DAHLIAE,, PHYTOPARASITICA 27(4):279-289
- **JONES,J.P.,ENGELHARD,A.W.ETWOLTZ,S.S.,1989.**MANAGEMENT OF FUSARIUM WILT OF VEGETABLES AND ORNAMENTALS BY MACRO-AND MICROELEMENT NUTRITION.DANSOILBORNE PLANT PATHOGENS :MANAGEMENT OF DISEASES WITH MACRO-AND MICROELEMENTS.
- **JOUAN B., LEMAIRE J. M., LEMARCHAND E., SANSON M. T., 1974.** MISE AU POINT SUR LA GANGRÈNE DE LA POMME DE TERRE (PHOMA EXIGUA VAR. EXIGUA ET VAR. FOVEATA). SCI. AGRON., RENNES, 97-110
- **KLOSTERMAN, S.J., ATALLAH, Z.K., VALLAD, G.E., AND SUBBARAO, K.V. (2009).** DIVERSITY, PATHOGENICITY, AND KLOSTERMAN, S.J., ATALLAH, Z.K., VALLAD, G.E., AND SUBBARAO, K.V. MANAGEMENT OF VERTICILLIUM SPECIES. ANNU. REV. PHYTOPATHOL. 47: 39– 62.
- **KUMAR R., TAPWAL A., KUMAR BORAH R. 2012.** VERTICILLIUM WILT INFECTING PARKIA ROXBURGHII SEEDLING IN MANIPURINDIA. ACADEMIC JOURNAL INC., 1-6.
- **LAMBERT,D.H., POWELSON,M.L. ET STEVENSON,W.R., 2005.** NUTRITION AL INTERACTIONS INFLUENCING DISEASES OF POTATO. AM. J. POTATO RES.82:309-319.
- **LE CAM, B., MASSIOT, P., AND ROUXEL, F. 1994.** CELL WALL POLYSACCHARIDE-DEGRADING ENZYMES PRODUCED BY ISOLATES OF MYCOCENTROSPORA ACERINA DIFFERING IN AGRESSIVENESS ON CARROT. PHYSIOL. MOL. PLANT PATHOL. 44:187-198.
- **LEHTINEN, U. 1993.** PLANT CELL WALL DEGRADING ENZYMES OF SEPTORIA NODORUM. PHYSIOL. MOL. PLANT PATHOL. 43:121-134.
- **M. NOVO, F. POMAR, C. GAYOSO, AND F. MERINO,2006.** DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, BIOLOGÍA VEGETAL Y

ECOLOGÍA, FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE A CORUÑA, LA ZAPATEIRA S/N 15071 A CORUÑA.

- **MARTINEZ,C, MICHAUD, M.,BELANGER,R.R. ET TWEDDELL,R.J.,2002.**
- **MCCAIN A. H., RAABE R. D., AND WILHELM S. (1981).** PLANTS RESISTANT OR SUSCEPTIBLE TO VERTICILLIUM WILT. COOPERATIVE EXTENSION, U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, UNIVERSITY OF CALIFORNIA, BERKELEY, 12 PP.
- **MULLER H., TEJEDOR –GONZALEZ E., MERCADO-BLANCO J., RODRIGUEZ JURADO D., JIMÉNEZ-DIAZ R.M., BERG G. 2007.** EFFET OF THE BIOLOGICAL CONTROL STRAIN SERRATIAPLYMUTHICAHRO C48 ON VERTICILLIUM WILT OF OLIVE TREES CV. ARBEQUINA . BULLETIN OILB/SROP., PP30:173-177
- **MUSSEL H.W., 1973.** ENDOPOLYGALACTURONASE ; EVIDENCE FOR INVOLVEMENT IN VERTICILLIUM WILT OF COTTON. PHYTOPATHOLOGY 63: 62-70.
- **NAM, M. H., JEONG, S. K., LEE, Y. S., CHOI, J. M. ET KIM, H. G., 2006.** EFFECTS OF NITROGEN, PHOSPHORUS, POTASSIUM AND CALCIUM NUTRITION ON STRAWBERRY ANTHRACNOSE. PLANT PATHOL. 55 : 246-249
- **NANNIPIERI P., GREGO S., CECCANTI B. 1990.** ECOLOGICAL SIGNIFICANCE OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY IN SOIL. IN: BOLLAG JM, STOTZKY G (EDS) SOIL BIOCHEMISTRY, VOL 6. MARCELDEKKER, NEW YORK, 293–355.
- **NYIRANSENGIYUMVA, C ,2007.** EFFET DE DIFFÉRENTS ÉLÉMENTS MINÉRAUX SUR LA CROISSANCE ET LE DÉVELOPPEMENT DU CHAMPIGNON HELMINTHOSPORIUM SOLANI, AGENT RESPONSABLE DE LA GALE ARGENTÉE DE LA POMME DE TERRE. P58.
- **PEGG G. F. (1984).** THE IMPACT OF VERTICILLIUM DISEASES IN AGRICULTURE, PHYTOPATHOL. MEDITERR.,23, 176-192.
- **PEGG G.F., BRADY B.L. 2002.** VERTICILLIUM WILTS (EDITEUR: CAB INTERNATIONAL). CABI PUBLISHING, WALLINGFORD, UK. 552P
- **PEGG, G. F. 1985.** LIFE IN A BLACK HOLE: THE MICRO-ENVIRONMENT OF THE VASCULAR PATHOGEN. TRANS. BR. MYCOL. SOC. 85:1-20.

- **REGRAGUI A., RAHOUTI M. ET LAHLOU H., 2003.** EFFET DU STRESS SALIN SUR VERTICILLIUM ALBOATRUM: PATHOGÉNÉCITÉ ET PRODUCTION D'ENZYMES CELLULOLYTIQUES IN VITRO. CRYPTOLOGIE, MYCOL. 24 (2) : 167-174.
- **RHIZOMES 2008.** AU JARDIN » PLANTES » FLEURS ANNUELLES ET BULBES D'ÉTÉ »
- **ROBERTS, D. P., DENNY, T. P., AND SCHELL, M. A. 1988.** CLONING OF THE EGL GENE OF PSEUDOMONAS SOLANACEARUM AND ANALYSIS OF ITS ROLE IN PHYTOPATHOGENICITY. J.BACTERIOL. 170:1445-1451.
- **RUSSEL, S. 1975.** THE ROLE OF CELLULASE PRODUCED BY VERTICILLIUM ALBO-ATRUM IN VERTICILLIUM WILT OF TOMATOES. PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT 82, 35–48.
- **SANOGO,S. ET YANG, X.B., 2001.**RELATION OF AND CONTENT, PH AND POTASSIUM AND PHOSPHORUS NUTRITION TO THE DEVELOPMENT OF SUDDEN DEATH SYNDROME IN SOYBEAN. CAN. J.PLANT PATHOL.23:174-180P.
- **SCHNATHORST W.C. AND MATHRE D.E., 1966.** HOST RANGE AND DIFFERENTIATION OF SEVERE FORM OF VERTICILLIUM ALBO-ATRUM IN COTTON. PHYTOPATHOLOGY, 56: 1156-1161.
- **SINGH, T.N., D. ASPINALL, L.G. PALEG ET S.F. BOGGES (1973).** STRESS METABOLISM. II. CHANGES IN PROLINE CONCENTRATION IN EXCISED PLANT TISSUES. AUST. J. BIOL. SCI., 26: 57-63.
- **SOMOBY, M. 1952.** NOTES ON SUGAR DETERMINATION. J. BIOL. CHEM. 195:19-23.
- **TAYLOR, G. A., 1954.** THE EFFECTS OF THREE LEVELS OF MAGNESIUM ON THE NUTRIENT ELEMENT COMPOSITION OF TWO INBRED LINES OF COM AND ON THEIR SUSCEPTIBILITY TO HELMINTHOSPORIUM MAYDIS. PLANT PHYSIOL. 29 : 87-91.
- **TRIKI M.A., HASSAÏRI A., MAHJOUB M. 2006.** PREMIÈRES OBSERVATIONS DE VERTICILLIUM DAHLIAE SUR OLIVIER EN TUNISIE. BULL EPPO BULL., 36 (1): 69–71.
- **WALTON, J. D. 1994.** DECONSTRUCTING THE CELL WALL. PLANT PHYSIOL. 104:1113-1118.

- **WHITAKER, A., 1976.** AMINO ACID TRANSPORT IN FUNGI : AN ESSAY. TRANS. BRIT. MYCOL. SOC. 67 : 365-376.
- **WHITNEY P.J., HEALE J.B. AND VAUGHAN J.G.,1972.** PROTEIN CHANGES IN VASCULAR WILT DISEASES OF LUCERNE CAUSED BY VERTICILLIUM ALBO-ATRUM R & B. JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY 23 (75): 400-414.
- **WILHELM S. 1955.** LONGEVITY OF THE VERTICILLIUM WILT FUNGUS IN LABORATORY AND FIELD. PHYTOPATHOLOGY,45:180–181.
- **WISNIEWSKI, M., DROBY, S., CHALUTZ, E. ET EILAM, Y., 1995.** EFFECTS OF CA⁺⁺ AND MG⁺⁺ ON BOTRYTIS CINEREA AND PÉNICILLIUM EXPANSUM IN VITRO AND ON THE BIOCONTROL ACTIVITY OF CANDIDA OLEOPHILA. PLANT PATHOL. 44 : 1016-1024.
- **WOOD R.K.S.; 1960.** PECTIC AND CELLULYTIC ENZYMES IN PLANT DISEASES (2-3). ABSTRACT. ANNU. REV. PHYSIOL. 11: 299-322.
- **YANGUI T., SAYADI S., GARGOUBI A., DHOUIB A. 2010.** FUNGICIDAL EFFECT OF HYDROXYTYROSOLRICH PREPARATIONS FROM OLIVE MILL WASTEWATER AGAINST VERTICILLIUM DAHLIAE. CROP PROTECTION 29:1208-1213

ANNEXE 1

COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE ET DES RÉACTIFS

- **Milieu PDA (Rapilly 1968)**

Élément	Quantité
Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée q.s.p	1000 ml

Peler, laver, couper en tranches minces les pommes de terre. Cuire 15 à 20 minutes dans 200 ml d'eau distillée, filtrer et presser. Ajouter le glucose au filtrat, compléter le volume à 1000 ml, ajuster le pH à 6,5. Ajouter l'agar, le dissoudre. Autoclaver 20 min à 120°C.

- **Milieu Czapeck-Dox (Rapilly 1968) Modifié par Novo (2006) CzDM**

Élément	Quantité
NaNO ₃	3 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,01 g
CMC	5 g
Eau distillée q.s.p	1000 ml

- **Composition du réactif de Bradford (Bradford M.,1976.)**

- Bleu brillant de Coomassie (BBC) G250 (Merck1544) 100 mg.

- Éthanol (Sigma-Aldrich) à 95% 50 ml.

Après agitation pendant 2 heures à l'abri de la lumière on ajoute :

- Acide ortho phosphorique (Sigma-Aldrich) à 85% 100 ml.

- Eau distillée q.s.p 1000 ml.

ANNEXE 2

ANALYSES STATISTIQUES

- **Test ANOVA**

ANOVA à 1 facteur

		Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Poids (mg MS)	Inter-groupes	58656,59	8,00	7332,07	5,38	0,00
	Intra-groupes	73647,83	54,00	1363,85		
	Total	132304,43	62,00			
Act. Glucanase (µM/min/gMS)	Inter-groupes	7,65	8,00	0,96	2,40	0,03
	Intra-groupes	21,11	53,00	0,40		
	Total	28,76	61,00			
Teneur en Protéine (g/g MS)	Inter-groupes	0,03	8,00	0,00	3,45	0,00
	Intra-groupes	0,06	54,00	0,00		
	Total	0,09	62,00			
Act. Glucosidase (µM PNP/min/g MS)	Inter-groupes	31,98	8,00	4,00	0,80	0,61
	Intra-groupes	270,08	54,00	5,00		
	Total	302,05	62,00			

- **Test de Tukey**

Poids (mg MS)

Test de Tukey

Traitement	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
		1	2
NH4Cl-1	7	90,400	
K2SO4-2	7	99,271	
MgCl2-2	7	118,214	118,214
Témoin	7	125,886	125,886
NHNO3-2	7	129,543	129,543
NHNO3-1	7	147,357	147,357
MgCl2-1	7		169,371
K2SO4-1	7		174,571
NH4Cl-2	7		178,057
Signification		0,115	,082

Act. Glucanase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{g MS}$)

Test de Tukey

Traitement	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
		1	2
MgCl ₂ -2	7	0,10	
Témoin	6	0,11	
NHNO ₃ -1	7	0,13	
MgCl ₂ -1	7	0,20	0,20
K ₂ SO ₄ -1	7	0,30	0,30
K ₂ SO ₄ -2	7	0,31	0,31
NHNO ₃ -2	7	0,43	0,43
NH ₄ Cl-1	7	0,58	0,58
NH ₄ Cl-2	7		1,28
Signification		0,89	0,06

Teneur en Protéine (g/g MS)

Test de Tukey

Traitement	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
		1	2
MgCl ₂ -2	7	0,033	
K ₂ SO ₄ -1	7	0,035	
NH ₄ Cl-2	7	0,042	0,042
Témoin	7	0,044	0,044
K ₂ SO ₄ -2	7	0,045	0,045
NH ₄ Cl-1	7	0,049	0,049
MgCl ₂ -1	7	0,060	0,060
NHNO ₃ -2	7		0,092
NHNO ₃ -1	7		0,094
Signification		0,827	0,090

Act. Glucosidase ($\mu\text{M PNP}/\text{min}/\text{g MS}$)

Test de Tukey

Traitement	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05
		1
NHNO3-1	7	2,92617
NH4Cl-2	7	2,98109
NH4Cl-1	7	3,43181
Témoin	7	3,58889
NHNO3-2	7	3,64774
MgCl2-2	7	4,10446
K2SO4-2	7	4,44317
MgCl2-1	7	4,87003
K2SO4-1	7	4,95860
Signification		0,744

- Corrélation de Pearson**

Corrélations TEMOIN

		Poid (mg MS)	Act. Glucanase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{gMS}$)	Teneur en Protéine (g/g MS)	Act. Glucosidase ($\mu\text{M PNP}/\text{min}/\text{g MS}$)
Poid (mg MS)	Corrélation de Pearson	1,00	-0,74	0,41	0,05
	Sig. (bilatérale)		0,10	0,37	0,92
	N	7,00	6,00	7,00	7,00
Act. Glucanase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{gMS}$)	Corrélation de Pearson	-0,74	1,00	-0,896	-0,14
	Sig. (bilatérale)	0,10		0,02	0,80
	N	6,00	6,00	6,00	6,00
Teneur en Protéine (g/g MS)	Corrélation de Pearson	0,41	-0,896*	1,00	0,30
	Sig. (bilatérale)	0,37	0,02		0,51
	N	7,00	6,00	7,00	7,00
Act. Glucosidase ($\mu\text{M PNP}/\text{min}/\text{g MS}$)	Corrélation de Pearson	0,05	-0,14	0,30	1,00
	Sig. (bilatérale)	0,92	0,80	0,51	
	N	7,00	6,00	7,00	7,00

*. La corrélation est significative au niveau 0.05 (bilatéral).

Corrélations NH4Cl_1

		Poid (mg MS)	Act. Glucanase (µM/min/gMS)	Teneur en Protéine (g/g MS)	Act. Glucosidase (µM PNP/min/g MS)
Poid (mg MS)	Corrélation de Pearson	1,00	-0,25	0,55	0,814*
	Sig. (bilatérale)		0,59	0,20	0,03
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Act. Glucanase (µM/min/gMS)	Corrélation de Pearson	-0,25	1,00	-0,31	-0,49
	Sig. (bilatérale)	0,59	0,50	0,50	0,27
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Teneur en Protéine (g/g MS)	Corrélation de Pearson	0,55	-0,31	1,00	0,70
	Sig. (bilatérale)	0,20	0,50		0,08
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Act. Glucosidase (µM PNP/min/g MS)	Corrélation de Pearson	0,814*	-0,49	0,70	1,00
	Sig. (bilatérale)	0,03	0,27	0,08	
	N	7,00	7,00	7,00	7,00

*. La corrélation est significative au niveau 0.05 (bilatéral).

Corrélations NH4Cl_2

		Poid (mg MS)	Act. Glucanase (µM/min/gMS)	Teneur en Protéine (g/g MS)	Act. Glucosidase (µM PNP/min/g MS)
Poid (mg MS)	Corrélation de Pearson	1,00	0,59	-0,30	0,68
	Sig. (bilatérale)		0,16	0,52	0,09
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Act. Glucanase (µM/min/gMS)	Corrélation de Pearson	0,59	1,00	-0,39	0,958**
	Sig. (bilatérale)	0,16	0,38	0,38	0,00
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Teneur en Protéine (g/g MS)	Corrélation de Pearson	-0,30	-0,39	1,00	-0,35
	Sig. (bilatérale)	0,52	0,38		0,45
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Act. Glucosidase (µM PNP/min/g MS)	Corrélation de Pearson	0,68	0,958**	-0,35	1,00
	Sig. (bilatérale)	0,09	0,00	0,45	
	N	7,00	7,00	7,00	7,00

** La corrélation est significative au niveau 0.01 (bilatéral).

Corrélations NHNO3_1

		Poid (mg MS)	Act. Glucanase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{gMS}$)	Teneur en Protéine (g/g MS)	Act. Glucosidase ($\mu\text{M PNP}/\text{min}/\text{g}$ MS)
Poid (mg MS)	Corrélation de Pearson	1,00	-0,17	-0,30	0,65
	Sig. (bilatérale)		0,71	0,51	0,11
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Act. Glucanase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{gMS}$)	Corrélation de Pearson	-0,17	1,00	-0,78	0,12
	Sig. (bilatérale)	0,71		0,04	0,79
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Teneur en Protéine (g/g MS)	Corrélation de Pearson	-0,30	-0,78	1,00	-0,67
	Sig. (bilatérale)	0,51	0,04		0,10
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Act. Glucosidase ($\mu\text{M PNP}/\text{min}/\text{g}$ MS)	Corrélation de Pearson	0,65	0,12	-0,67	1,00
	Sig. (bilatérale)	0,11	0,79	0,10	
	N	7,00	7,00	7,00	7,00

*. La corrélation est significative au niveau 0.05 (bilatéral).

Corrélations NHNO3_2

		Poid (mg MS)	Act. Glucanase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{gMS}$)	Teneur en Protéine (g/g MS)	Act. Glucosidase ($\mu\text{M PNP}/\text{min}/\text{g}$ MS)
Poid (mg MS)	Corrélation de Pearson	1,00	0,73	0,10	-0,72
	Sig. (bilatérale)		0,06	0,84	0,07
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Act. Glucanase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{gMS}$)	Corrélation de Pearson	0,73	1,00	0,16	-0,39
	Sig. (bilatérale)	0,06		0,74	0,39
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Teneur en Protéine (g/g MS)	Corrélation de Pearson	0,10	0,16	1,00	-0,33
	Sig. (bilatérale)	0,84	0,74		0,48
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Act. Glucosidase ($\mu\text{M PNP}/\text{min}/\text{g}$ MS)	Corrélation de Pearson	-0,72	-0,39	-0,33	1,00
	Sig. (bilatérale)	0,07	0,39	0,48	
	N	7,00	7,00	7,00	7,00

Corrélations K2SO4_1

		Poid (mg MS)	Act. Glucanase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{gMS}$)	Teneur en Protéine (g/g MS)	Act. Glucosidase ($\mu\text{M PNP}/\text{min}/\text{g}$ MS)
Poid (mg MS)	Corrélation de Pearson	1,00	0,43	-0,32	0,51
	Sig. (bilatérale)		0,34	0,48	0,24
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Act. Glucanase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{gMS}$)	Corrélation de Pearson	0,43	1,00	-0,05	0,40
	Sig. (bilatérale)	0,34		0,92	0,37
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Teneur en Protéine (g/g MS)	Corrélation de Pearson	-0,32	-0,05	1,00	-0,34
	Sig. (bilatérale)	0,48	0,92		0,45
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Act. Glucosidase ($\mu\text{M PNP}/\text{min}/\text{g}$ MS)	Corrélation de Pearson	0,51	0,40	-0,34	1,00
	Sig. (bilatérale)	0,24	0,37	0,45	
	N	7,00	7,00	7,00	7,00

Corrélations K2SO4_2

		Poid (mg MS)	Act. Glucanase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{gMS}$)	Teneur en Protéine (g/g MS)	Act. Glucosidase ($\mu\text{M PNP}/\text{min}/\text{g}$ MS)
Poid (mg MS)	Corrélation de Pearson	1,00	-0,12	-0,52	0,29
	Sig. (bilatérale)		0,80	0,23	0,54
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Act. Glucanase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{gMS}$)	Corrélation de Pearson	-0,12	1,00	0,08	-0,43
	Sig. (bilatérale)	0,80		0,86	0,34
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Teneur en Protéine (g/g MS)	Corrélation de Pearson	-0,52	0,08	1,00	-0,88
	Sig. (bilatérale)	0,23	0,86		0,01
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Act. Glucosidase ($\mu\text{M PNP}/\text{min}/\text{g}$ MS)	Corrélation de Pearson	0,29	-0,43	-0,88	1,00
	Sig. (bilatérale)	0,54	0,34	0,01	
	N	7,00	7,00	7,00	7,00

** . La corrélation est significative au niveau 0.01 (bilatéral).

Corrélations MgCl2_1

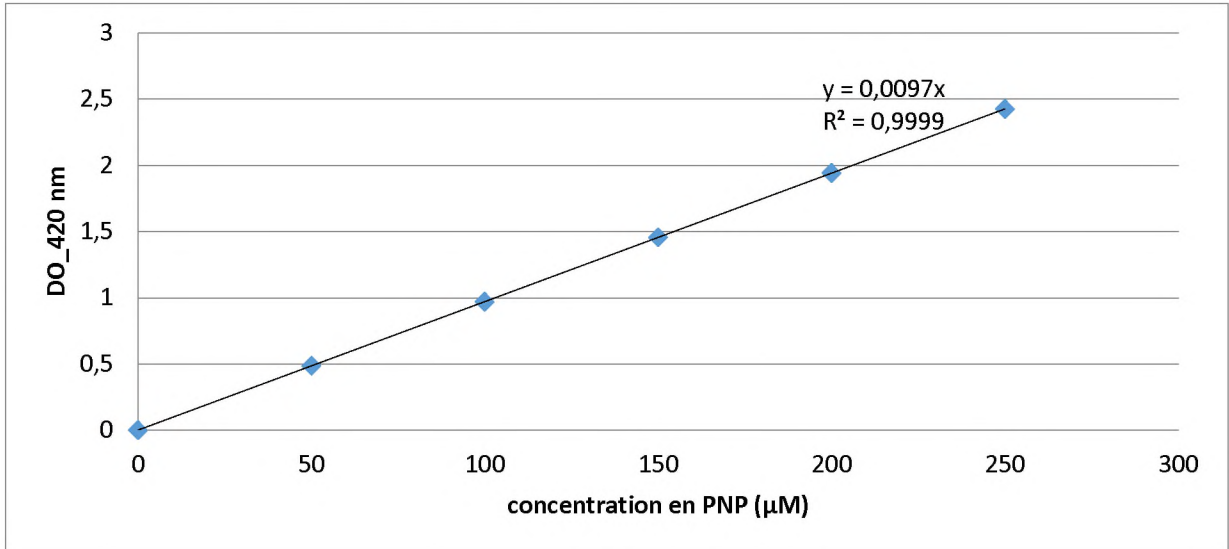
		Poid (mg MS)	Act. Glucanase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{gMS}$)	Teneur en Protéine (g/g MS)	Act. Glucosidase ($\mu\text{M PNP}/\text{min}/\text{g}$ MS)
Poid (mg MS)	Corrélation de Pearson	1,00	-0,13	-0,54	0,60
	Sig. (bilatérale)		0,78	0,21	0,16
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Act. Glucanase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{gMS}$)	Corrélation de Pearson	-0,13	1,00	-0,24	-0,08
	Sig. (bilatérale)	0,78		0,61	0,87
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Teneur en Protéine (g/g MS)	Corrélation de Pearson	-0,54	-0,24	1,00	-0,72
	Sig. (bilatérale)	0,21	0,61		0,07
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Act. Glucosidase ($\mu\text{M PNP}/\text{min}/\text{g}$ MS)	Corrélation de Pearson	0,60	-0,08	-0,72	1,00
	Sig. (bilatérale)	0,16	0,87	0,07	
	N	7,00	7,00	7,00	7,00

Corrélations MgCl2_2

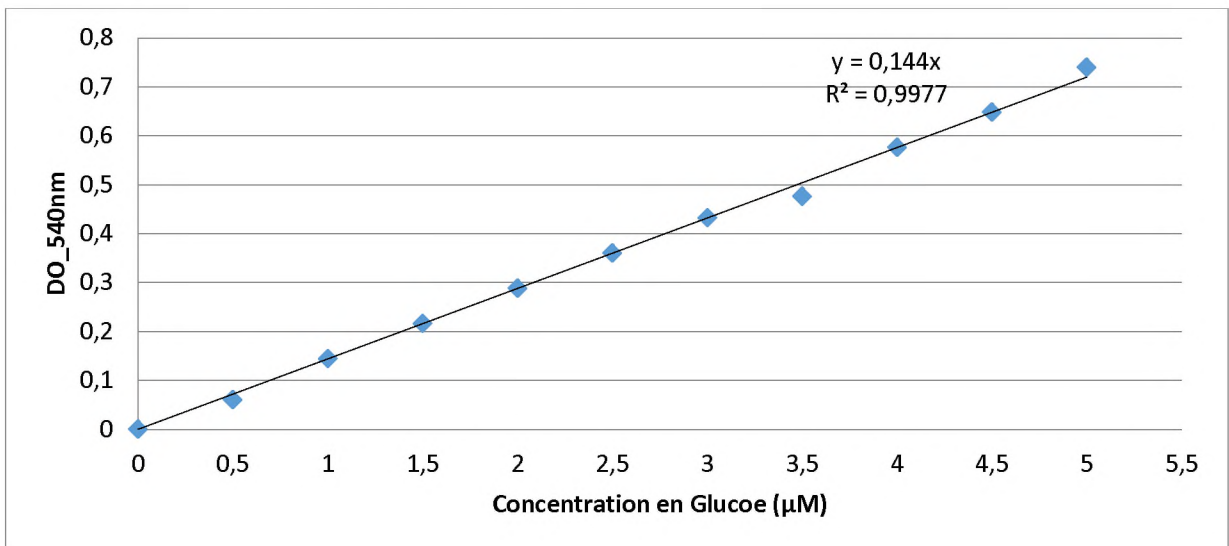
		Poid (mg MS)	Act. Glucanase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{gMS}$)	Teneur en Protéine (g/g MS)	Act. Glucosidase ($\mu\text{M PNP}/\text{min}/\text{g}$ MS)
Poid (mg MS)	Corrélation de Pearson	1,00	0,08	-0,21	-0,03
	Sig. (bilatérale)		0,86	0,65	0,96
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Act. Glucanase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{gMS}$)	Corrélation de Pearson	0,08	1,00	-0,26	0,37
	Sig. (bilatérale)	0,86		0,58	0,42
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Teneur en Protéine (g/g MS)	Corrélation de Pearson	-0,21	-0,26	1,00	0,72
	Sig. (bilatérale)	0,65	0,58		0,07
	N	7,00	7,00	7,00	7,00
Act. Glucosidase ($\mu\text{M PNP}/\text{min}/\text{g}$ MS)	Corrélation de Pearson	-0,03	0,37	0,72	1,00
	Sig. (bilatérale)	0,96	0,42	0,07	
	N	7,00	7,00	7,00	7,00

ANNEXE 3 COURBES ÉTALONS

1- Courbe étalon du p-nitrophenyle



2- Courbe étalon du Glucose



3- Courbe étalon du sérum albumine bovine (SAB)

