

الجمهورية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة سعد دحلب البليدة (1)

Université SAAD DAHLEB-Blida



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière : Sciences Biologiques

Option : Génétique

Thème

**Identification génotypique de l'espèce *Verticillium dahliae* agent
de la verticilliose de l'olivier en Algérie.**

Présenté par :

HADJ KHELIFA Nassima

LATRECHE Wissam

Soutenu le :

03/07/2024

Devant le jury :

Nom

Ms MOHAMED SAID .R

Mme BENMANSOUR .N

Mme BELKHITER .S

Ms BENINAL .I

Grade/Lieu

MAA /USDB1

MCB/USDB1

MCB/USDB1

Docteur /CNCC

Qualité

Président

Examinatrice

Promotrice

Co-promoteur

Année universitaire : 2023/2024

Remerciements

Tout d'abord, nous ne pouvons pas faire ce travail sans la bénédiction et la sans force d'Allah.

*Nous commençons par exprimer nos vifs remerciements à notre promotrice **Mme BELKHITER Siham** qui a guidé notre mémoire, et nous la remercions aussi pour son soutien constant et sa disponibilité.*

*Nous adressons le grand remerciement à notre **Co-promoteur BENINAL Ilyes** pour son aide, sa disponibilité, ses conseils, ses remarques, son encouragement et sa confiance qui nous ont permis de réaliser ce travail, nous tenons à exprimer notre plus profond respect.*

*Nous tenons particulièrement à remercier **Mr MOHAMED SAID Remdane** Pour avoir accepté de présider le jury.*

*Nous souhaitons exprimer notre gratitude à **BENMANSOUR** pour accepter d'examiner ce travail.*

Un grand merci à tous les enseignants de notre faculté à l'université de

Blida 1.

Merci à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de notre projet, trouve ici l'expression de nos sincères sentiments.

Merci ...

Dédicace

Grâce à dieu le tout puissant, j'ai achevé la réalisation de ce modeste travail que je tien très chaleureusement a le dédier:

*A ma mère **KHEDIM Naima**, il n'y a pas un jour où tu me manques. Votre force, votre amour et votre sagesse ont été le fondement sur lequel j'ai construit ma vie. Chaque réussite, chaque défi surmonté, je vous le dois. Cette thèse, fruit de beaucoup de travail et de persévérance, est dédiée à votre mémoire. Repose en paix je t'aime maman.*

*Je suis ta fierté mon cher père **Mohamed**, ta sagesse, ta force et ton amour inconditionnel ont toujours été mon guide. Vous êtes mon modèle, mon soutien et mon inspiration. Merci pour tous les sacrifices, les moments partagés et les leçons de vie*

*La femme qui est chère à mon cœur, ma tante **Fadila**, m'a soutenu dans toutes les circonstances de ma vie, je n'oublierai jamais ta bonté.*

J'aimerais que tu sois là, grand-mère Bakhta, qui m'a quitté en t'aimant, pour partager avec moi la joie que je chéris. Je garderai toujours en mémoire vous et vos prières pour moi

*A mes frères **Abd Al Rahman, Hamza et Sid Ali**, Mes sœurs **Maria et Iman** pour tous vos encouragement.*

*A mes copines de toujours **Malak, Abla, Zozo, Khaoula, Chaima, Faiza et chourouk** et pour tout mes amis.*



Nassima

Résumé

La verticilliose est l'une des maladies les plus graves de l'olivier, causée par un champignon connu sous le nom de *Verticillium dahliae* Kleb. Celui-ci a un impact sur le rendement et la qualité organoleptique des olives. La verticilliose se manifeste par un dessèchement soudain d'un ou plusieurs rameaux ou de branches plus grosses. L'objectif de notre travail est l'isolement de l'agent pathogène qui cause la verticilliose chez les oliviers à partir d'échantillons infectés récoltés dans différentes régions de l'Algérie (Tipaza, Blida, Skikda, Bourdj Bou Arreridj). Après repiquage successif sur milieu PDA, l'isolat est purifié et ensuite identifié sur le plan microscopique et macroscopique. Nous avons également effectué une analyse bioinformatique pour traiter des données informatiques liées à un gène codant pour une protéine sérine/thréonine kinase qui joue un rôle dans la pathogénicité de l'espèce *V. dahliae*. Concernant l'isolement, les tentatives ont échoué, conduisant à l'isolement de d'autres espèces fongiques comme *Alternaria* spp.

Cependant, l'étude bioinformatique qui s'est concentrée sur le gène VDAG_05856 codant pour une sérine/thréonine protéine kinase chez *V. dahliae*, un pathogène fongique affectant l'olivier. Les résultats ont montré que le gène est localisé sur le chromosome 4 et caractérisé comme ayant 3 exons, un ARNm de 2547 nucléotides, et codant pour une protéine de 848 acides aminés. L'analyse phylogénétique a révélé une proximité génétique entre *V. dahliae* et *V. nonalfalfae*, ainsi que des régions génomiques spécifiques à *V. dahliae*. La structure tridimensionnelle de la protéine a été prédite avec une haute confiance, montrant une similarité de 99,5 % avec une protéine de *V. longisporum*. Bien que sa localisation subcellulaire précise n'ait pas été déterminée, elle est probablement cytoplasmique avec une possible association aux membranes intracellulaires. Son rôle potentiel dans la pathogénicité, la morphogénèse et l'agressivité du champignon a été discuté.

Mot-clé : verticilliose d'olivier, *Verticillium dahliae*, protéine sérine/thréonine kinase, , VDAG_05856, l'arbre phylogénétique.

Abstract

Verticillium wilt is one of the most serious diseases of the olive tree, caused by a fungus known as *Verticillium dahliae* Kleb. It has an impact on the yield and organoleptic quality of olives. Verticillium wilt is manifested by the sudden drying out of one or more twigs or larger branches. The aim of our work is to isolate the pathogen that causes verticillium wilt in olive trees from infected samples collected in different regions of Algeria (Tipaza, Blida, Skikda, Bourdj Bou Arreridj). After successive subculturing on PDA medium, the isolate was purified and then identified microscopically and macroscopically. We also carried out a bioinformatics analysis to process computer data linked to a gene coding for a serine/threonine kinase protein that plays a role in the pathogenicity of the *V. dahliae* species. Attempts at isolation were unsuccessful, leading to the isolation of other fungal species such as *Alternaria spp.*

However, the bioinformatics study focused on the VDAG_05856 gene encoding a serine/threonine protein kinase in *V. dahliae*, a fungal pathogen affecting olive trees. The results showed that the gene is located on chromosome 4 and characterised as having 3 exons, an mRNA of 2547 nucleotides, and encoding a protein of 848 amino acids. Phylogenetic analysis revealed genetic proximity between *V. dahliae* and *V. nonalfalfae*, as well as genomic regions specific to *V. dahliae*. The three-dimensional structure of the protein was predicted with high confidence, showing 99.5% similarity to a *V. longisporum* protein. Although its precise subcellular location has not been determined, it is probably cytoplasmic with a possible association with intracellular membranes. Its potential role in the pathogenicity, morphogenesis and aggressiveness of the fungus has been discussed.

Key words: olive wilt, *Verticillium dahliae*, protein serine/threonine kinase, , VDAG_05856, phylogenetic tree.

ملخص

الذبول النريسييلوم هو أخطر الأمراض التي تصيب شجرة الزيتون، ويسببه فطر يعرف باسم أحد

Verticillium dahliae Kleb. وله تأثير على المحصول والجودة الحسية للزيتون. يتجلى الذبول النريسييلوم من خلال الجفاف المناحي لغصن أو أكثر من الأغصان أو الأغصان الكبيرة. الهدف من عملنا هو عزل العوامل الممرض المسبب للذبول النريسييلوم في أشجار الزيتون من العينات المصابة التي تم جمعها في مناطق مختلطة من الجزائر (تيزابزة، البلدة، سكيكدة، برج بوعريجة). بعد الزراعة النرجية المتأخرة على وسط PDA، تم تربية المعزولة ثم تم تحديدها مجهرياً ومجهرياً. كما أجرينا أيضاً تحليلاً للمعلوماتية الحيوية لمعالجة البيانات الحاسوبية المرتبطة بحين يرمز لبروتين سبرين/ثريونين كيناز الذي يلعب دوراً في الأمراض الفيروسية *V. dahliae*. لم ننجح محاولات العزل، مما أدى إلى عزل أنواع فطرية أخرى مثل *Alternaria spp*.

ومع ذلك، ركزت دراسة المعلوماتية الحيوية على الجين *VDAG_05856* الذي يشتر بروتين كيناز سبرين/ثريونين كيناز في *V. dahliae*، وهو ممرض فطري يصيب أشجار الزيتون. أظهرت النتائج أن الجين يُعبر عن الكروموسوم 4 ويتميز بوجود 3 إكسونات، وحمض نووي مرسال يبلغ 2547 نيوكلويداً، ويترجم بر 848 حمضاً أمينياً. كشف التحليل الوراثي عن وجود توارب جيني بين بكتيريا *V. dahliae* و *V. nonalfalfae*، بالإضافة إلى مناطق جينومية خاصة ببكتيريا *V. dahliae*. تم التنبؤ بالتركيب ثلاثي الأبعاد للبروتين بنقطة عالية، حيث أظهر نشاطاً بروتينياً 99.5% مع بروتين *V. longisporum*. على الرغم من أنه لم يتم تحديده موقعه تحت الخلوي بدقة، إلا أنه من المحتمل أن يكون مسؤولاً عن ارتباطه بالأغشية داخل الخلية. وقد تمت مناقشة دوره المحتمل في الأمراض الفيروسية والنشك والعدوانية للفطر.

الكلمات المفتاحية: ذبول الزيتون، نريسييلوم دالهاي، بروتين سبرين/ثريونين كيناز، *VDAG_05856*، شجرة الزيتون والنشوء والتطور.

Liste abréviation

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide Riboucléique
ARNm	Acide RiboNucléique Messenger
ATP	Adénosine-TriphosPhate
av. J-C	Avant Jésus-Christ
ARN-seq	Basic Local Alignment Search Tool
BLDOT	Bond Length Distribution Optimization Target
CNCC	Centre National de Contrôle et de Certification des semences et des plante.
d	Diamètre initial de l'explant
D	Diamètre de la colonie
EPA	Établissement Public à caractère Administratif
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database
FASTA	Fast Alignment Search Tool -All
KB	Kilobase
L	Croissance linéaire
LS	Ligne Spécifique
M	mètre
Mb	MégaBase
MI	MilliLitre
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OEPP	Organisation Européenne et méditerranéenne pour la Protection des Plantes
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
Pb	Paire de bases
PDA	Potato Dextrose Agar.
PLDDT	Predicted Local Distance Difference Test
PRR	Pattern Recognition Receptors
S/T	Serine /Thréonine
UNIPORT	Universal Protein Resource
Vd	Verticillium Dahliae
VdLs.17	Verticillium Dahliae souche 17
µm	microMètre

Liste des figures

Figure 01 : Répartition géographique de l'Olivier	04
Figure 02 : Zone de répartition géographique de culture de l'olivier dans le bassin Méditerranéen.....	04
Figure 03 : Répartition de la zone oléicole en Algérie (a : la carte géographique,b : pourcentage de production)	05
Figure 04 : Description de l'Olivier <i>Olea europea</i> L.: A : Arbre aspect général B : Fruits de l'olivier ; C: Tronc d'olivier (Artaud, 2008) ;D : Feuille;E : Fleurs	06
Figure05 :Symptômes du flétrissement verticillien chez les oliviers.....	09
Figure 06 : Cycle biologique de <i>Verticillium dahliae</i>	10
Figure 07 : Photomicrographie de <i>V. dahliae</i> : A : Aspect microscopique général du Champignon, A:40X (CF=conidiospores, F=phialides, C=conidies, M=mycélium); B : Colonie de microsclérotés, A : 40X.	11
Figure 08 : Carte de la wilaya de Tipaza et Blida et bordj-bou- Arreridj et Skikda Montrant les zones d'échantillonnages	14
Figure 09 : Echantillonnages des matériaux d'essais présentant le symptôme de Verticilliose de l'olivier	15
Figure 10 : Arbre d'olivier d'essais présentant le symptôme de la verticilliose dans Wilaya de Tipaza	16
Figure11 : Préparation de milieu de culture PDA	18
Figure 12 :Protocole d'isolement des isolats de <i>Verticilliumdahliae</i>	18
Figure13 : Purifications des espèces fongiques obtenues lors des opérations d'isolements	19
Figure14 : Observation macroscopique des colonies	20

Figure15 : Observation microscopiques sur lame et lamelle à l'aide d'un Microscope photonique	21
Figure 16 : Format FASTA de la protéine	23
Figure17 : L'interface de l'outil d'analyse des séquences BLAST.....	24
Figure18 :L'alignement multiple de séquences de d'autres souches ou d'organismes Génétiquement proches	24
Figure19 : Interface de la base de données UniProt.....	25
Figure 20 :Colonies fongiques obtenues lors des isolements réalisés à partir de tiges et de rameaux de l'olivier sur milieu PDA	27
Figure 21 : Aspect cultural d'un champignon obtenu lors des isolements réalisés à partir de tiges et de rameaux de l'olivier sur milieu PDA	28
Figure 22 : Aspects microscopiques des conidies et conidiophores de l'Alternariaspp sur le milieu PDA.....	29
Figure23 : La position du gène VDAG_05856 (NCBI Gene).....	30
Figure24 : le nombre de nucléotide dans ARNm dans gène VDAG 05856 (NCBI nucléotide).....	30
Figure 25 : Alignement des séquences des acides aminés de la protéine sérine /thréonine kinase CLA4 (Swiss-model).....	31
Figure26 : arbre phylogénétique intraspécifique Verticillium... ..	33
Figure27 : Structure tridimensionnel de la protéine (UniProt,2024).....	35
Figure 28 : Mode d'action de la protéine sérine/thréonine protéine kinase dans cytoplasme (NCBI,2024).....	36

Liste des tableaux

Tableau I : bases de données utilisées.....	23
Tableau II : Pourcentage de similarité entre les structure de la protéine sérine/thréonine kinase et <i>Verticillium dahliae</i> , souche VdLs17.....	34

Sommaire

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 01

Chapitre I : rappel bibliographique

I.L'olivier *Olea europaea* 03

I.1.1. Historique sur l'olive 03

I.1.2. Répartition géographique de l'olivier 03

I.1.3. Description de la plante 05

I.1.4. Gammes variétales de l'olivier en Algérie 06

I.2. *Verticillium dahliae* Kleb agent pathogène de la verticilliose de l'olivier 08

I.2.1. Maladies de l'Olivier..... 08

I.2.2. Flétrissement verticillien causé par *Verticillium dahliae* Kleb 08

I.2.3. Symptomatologie 08

I.2.4. Cycle biologique et épidémiologique de la maladie 09

I.2.5. Taxonomie de l'agent causal 10

I.2.6. Description de l'agent pathogène *Verticillium dahliae* Kleb 11

I.2.7. Lutte contre la maladie 12

I.2.8. Interaction hôte-pathogène 12

I.2.9. Interactions spécifiques entre l'hôte et le pathogène *Verticillium dahliae* par l'intermédiaire des protéines Serine/Thréonine kinase 13

I.2.10. Structure et Fonction des Protéines Serine/Thréonine kinase 13

Chapitre II: Matériels et méthodes

II.1. Objectif, lieu et période d'étude 14

II.2. Superficies et situation géographique 14

II.3. Prospection et récolte des échantillons présentant les symptômes de la verticilliose 15

II.4. Conservation des échantillons 16

II .5. Matériels utilisés dans notre étude 16

II.6.Méthode	17
II.6.1. Préparation du milieu de culture.....	17
II.6.2. Isolement et purification des isolats.....	18
II.6.3. Purification des champignons.....	19
II.6.4. Identification des isolats de <i>Verticillium dahliae</i>	20
II.6.5. Caractérisation morphologique des isolats.....	21
II.7. Analyse bioinformatique.....	23
II.7.1. Matériels.....	23
II.7.2.Méthodes.....	23
II.7.2.1. Recherche de la séquence de la protéine d'intérêt	23
II.7.2.2. Analyse de la séquence	24
II.7.2.3. Analyse phylogénétique	24
II.7.2.4. Alignement multiple de séquences	25
II.7.2.5. Prédiction de la structure 3D et amarrage moléculaire	25

Chapitre III: Résultats et discussion

III.1. Obtention des isolats de <i>Verticillium dahliae</i>	26
III.2. Identification conventionnelle des isolats obtenus.....	27
III.3. Identification de Gene VDAG_05856 sérine /thréonine protein kinase(<i>Verticillium dahliae</i> VdLs.17).....	29
III.4. Etude de la variabilité génétique intra -spécifique concernant le gène	31
III.5. Structure tridimensionnels de la protéine	33
III.6.-.Emplacement subcellulaire de la sérine/thréonine protéine kinase dans cytoplasme	35

Conclusion générale

Conclusion et perspective	37
--	----

Références bibliographique

Références web .

Introduction

Introduction

L'olivier (*Olea europaea* L.), originaires de la région méditerranéenne, sont l'une des plus anciennes espèces d'arbres cultivés dans le monde (Barazaniet *al*, 2023).

La superficie totale des oliviers cultivés dans le monde est estimée à 10,1 millions d'hectares en 2023 (FAOSTAT, 2023)

En Algérie, l'olivier constitue, par les superficies qu'il occupe, le principal groupe d'espèces fruitières (FAOSTAT, 2023). Il a suscité un intérêt particulier ces dernières années non seulement au niveau des principales régions oléicoles traditionnelles à l'échelle nationale, mais aussi au niveau d'autres régions considérées comme réfractaires à son expansion grâce à sa rusticité, sa capacité d'adaptation aux différents types de sols et aux conditions climatiques (Mendil et Sebail, 2006). Ce regain d'intérêt est dû, en plus à l'intérêt socio-économique et environnemental de cette espèce et aux qualités sanitaires et nutritionnelles de l'huile d'olive.

L'olivier est la cible de plusieurs bio-agresseurs tels que les champignons, les virus, les bactéries, les nématodes et les insectes. La verticilliose ou le flétrissement verticillien causé par le champignon *Verticillium dahliae* Kleb constitue une menace pour la production d'olives (Jeseničnik et *al.*, 2023). Le champignon hémibiotrophe, transmis par le sol, *V. dahliae* est responsable de pertes économiques pour une gamme d'hôtes de 200 espèces dans le monde, y compris les oliviers.

Ce pathogène prospère dans la région méditerranéenne, connue pour être le premier producteur mondial d'olives (Acharya et *al.*, 2020). En effet, des rapports ultérieurs ont signalé la présence de flétrissement verticillien causé par *Verticillium dahliae* Kleb. En Espagne par Jiménez-Díaz et *al.* (2009), en Syrie par Al-Ahmad et Mosli (1993), au Maroc par Serrhini et Zeroual (1995), en Algérie par Bellahcene et *al.* (2000), en Italie par Nigro et *al.* (2005) et en Turquie par Dervis et *al.* (2010).

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'étude de cette maladie dans les oliveraies de quatre zones d'étude à savoir : Tipaza, Blida, BourdjBou Arriredjet Skikda.

Le présent travail s'articule au tour de trois parties essentielles:

Première partie : Synthèse bibliographique:

Cette partie traite deux volets concernant le pathosystème *Olea europaea/Verticillium dahliae*.

Deuxième partie: Matériel et méthodes

- Expérimentation : Cette partie concerne l'expérimentation, la présentation des stations d'étude, la méthodologie adoptée sur le terrain et en laboratoire, l'isolement, la caractérisation micro et macroscopique des isolats de *Verticillium dahliae* Kleb. à partir du bois d'olivier.
- Analyse bioinformatique : Cette partie traite des données informatiques liées à un gène codant pour une protéine sérine/thréonine kinase impliquée dans la pathogénicité de *Verticillium dahliae*, un champignon pathogène des plantes.
- L'objectif est d'obtenir des informations précieuses sur les mécanismes de cette protéine kinase, dans le but de développer de nouvelles stratégies de lutte contre le flétrissement verticillien et d'autres maladies des plantes.
- Deux approches sont mentionnées pour atteindre cet objectif:
- Caractériser la structure tridimensionnelle de la protéine.
- Identifier des récepteurs de cette protéine.
- Cela permettrait de développer des molécules capables de bloquer son mécanisme d'action.

Troisième partie: Résultats et discussion : Cette partie renferme les résultats et discussion.

Chapitre I :
rappel
bibliographique.

I. 1. L'olivier *Olea europaea* L.,

Historique sur l'olivier

L'olivier est un arbre fortement symbolique dans les cultures méditerranéennes, associé aux mythes fondateurs, représentant la force, la victoire, la sagesse, la fidélité, l'immortalité, l'espérance, la richesse, l'abondance, la longévité et la paix (Breton et *al.*, 2006).

Concernant les premiers cultivateurs de l'olivier, deux théories s'opposent : certains évoquent la Phénicie, d'autres la Crète où des amphores (Pithoi) datant de 3500 av. J-C contenant de l'huile d'olive ont été découvertes, témoignant d'un commerce important de ce produit (Amouretti et Comet, 2000).

Dans la Grèce antique, les oliviers étaient quasi vénérés et protégés par des lois interdisant la vente de leur bois et limitant leur taille. Le commerce de l'huile d'olive, lié au pouvoir économique et religieux, était très contrôlé (Amouretti et Comet, 2000).

Répartition géographique de l'olivier

a. Dans le monde

L'origine géographique de l'olivier (*Olea europaea*) semble être le croissant fertile (Rugini et *al.* 1998 ; Loumon et Giourage, 2003). Son introduction en Méditerranée occidentale est attribuée aux Phéniciens (Loussert et Brousse, 1978).

Le complexe *Olea europaea* est distribué mondialement selon différentes sous-espèces (Fig. 1). Avec 10,1 millions d'hectares, l'olivier occupe le 24^e rang des espèces les plus cultivées au monde (FAOSTAT, 2023). Il est présent en Chine, Japon, États-Unis, Mexique dans l'hémisphère Nord, et en Afrique du Sud et Amérique du Sud dans l'hémisphère Sud (Verdier, 2003).

En Afrique, les principaux pays oléicoles sont la Tunisie, le Maroc, l'Algérie, la Libye, l'Égypte, l'Afrique du Sud et l'Angola. En Europe, ce sont l'Espagne, l'Italie, la Grèce, le Portugal, l'Albanie, Chypre, la France, la Slovénie et Malte. Au Moyen-Orient et en Asie, la Turquie, la Syrie, la Palestine, le Liban, la Jordanie, l'Irak et l'Iran (Verdier, 2003).

Le bassin méditerranéen reste une zone privilégiée pour l'olivier grâce à son climat adéquat en termes de température et d'hydrométrie (Fig. 2) (Verdier, 2003).

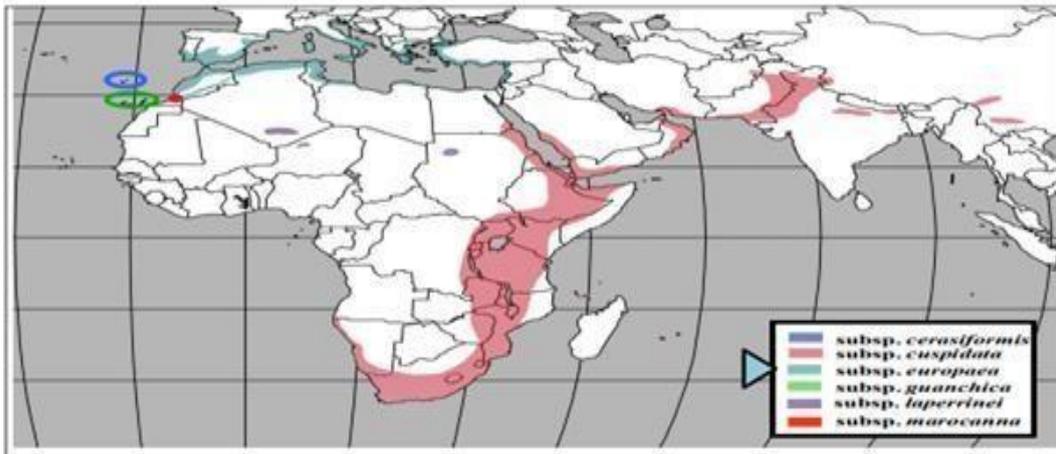


Figure1. Répartition géographique de l’Olivier (Rubio de Casas et al., 2006).



Figure 2. Zone de répartition géographique de la culture de l’olivier dans le bassin Méditerranéen (Lemme et Ramd ,2008).

b. En Algérie

L'Algérie fait partie des principaux pays méditerranéens au climat favorable à la culture de l'olivier, qui constitue une des principales essences fruitières à l'échelle nationale (Benderradji et al, 2007 ; Babouche et Kellouche, 2012).

Le verger oléicole algérien compte environ 32 millions d'arbres (Bensemmane, 2009 ; Mendil, 2009)répartis sur 328 884 hectares, soit 34,09% du verger arboricole national (FAOSTAT,2022).L'olivier remplit des fonctions multiples de lutte contre l'érosion.

Valorisation des terres et fixation des populations dans les zones de montagne, sur tout le territoire.

Il se concentre principalement dans trois régions : le Centre (54%), l'Est (29%) et l'Ouest (17%). Dans la région du Centre, 95% du verger oléicole se situe dans les wilayas de Béjaïa, Tizi- Ouzou et Bouira (Chaux in Sekour, 2012) (Fig.3).

L'oléiculture occupe donc une place prépondérante dans l'agriculture algérienne, répartie sur l'ensemble du territoire mais avec de fortes concentrations régionales, grâce aux conditions climatiques favorables.

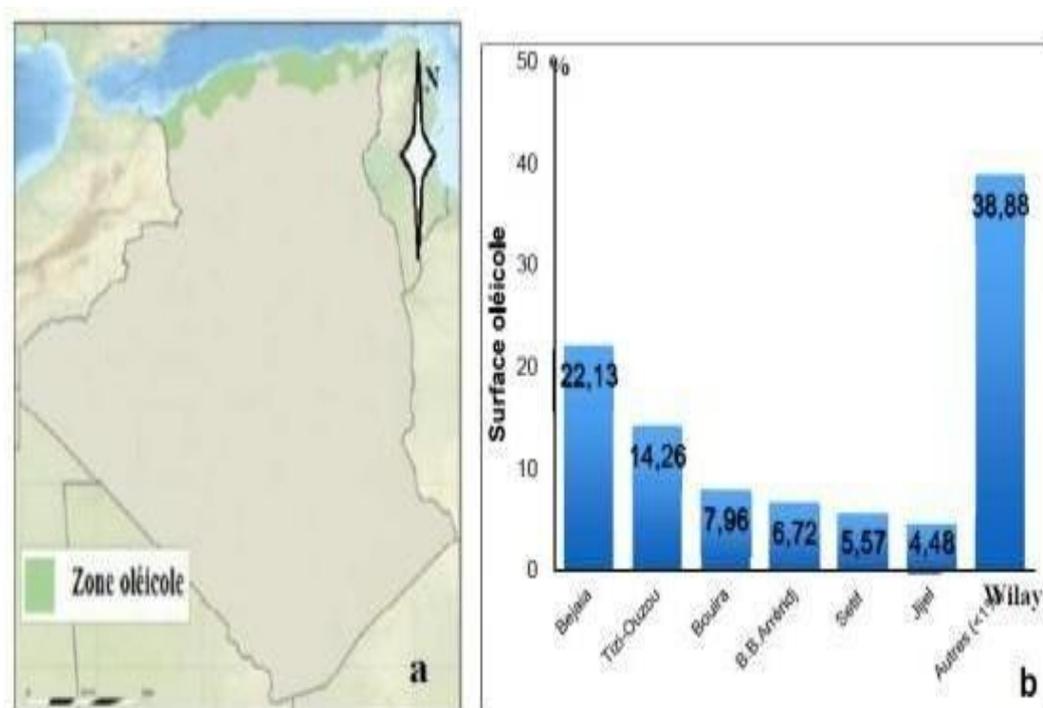


Figure 3. Répartition de la zone oléicole en Algérie (a: la carte géographique, b: pourcentage de production) (Oreggia et Marinelli, 2017).

Description de la plante

L'olivier (*Olea europaea* L.) est un arbre cultivé appartenant à la famille des Oléacées (Breton et al., 2006). C'est une espèce à feuillage persistant pouvant atteindre 15 m de haut avec une long évité dépassant souvent 500ans, voire 2000 ans pour certains spécimens

(Bartoloni et *al.*, 2008). Les fruits n'apparaissent qu'après 7 ans environ après plantation (Avenard, 2008) (Fig. 4).

Sur le plan botanique, l'olivier fait partie de l'embranchement des Spermaphytes, sous-embranchement des Angiospermes, classe des Dicotylédones, ordre des Gentianales et famille des Oléacées (Pagnol, 1975). Le genre *Olea* comprend 35 espèces réparties sur les 5 continents (Abou-Argoub, 1998).

L'olivier adulte a un tronc noueux, un bois dur et dense, une écorce brune crevassée (Beck et Danks, 1983). Son système racinaire comprend quelques racines pivotantes profondes et un réseau de racines latérales superficielles (Kasraoui, 2010). Les feuilles sont persistantes, opposées, coriaces et ovales (Amouretti, 1985). Les fleurs sont regroupées en inflorescences (Loussert et Brousse, 1978). Les fruits sont des drupes ovoïdes devenant noires à maturité, à pulpe charnue et huileuse (Rol et Jacamon, 1988).

Le cycle végétatif annuel comprend une période de repos végétatif en hiver, un débourrement fin février, une floraison de mai à juin, une maturation des fruits de juillet à décembre (Millard, 1975).

Gammes variétales de l'olivier en Algérie

En Algérie, On dénombre XXX variétés d'oliviers homologués (J.O. n° 59 du 08 octobre 2018). Les variétés les plus multipliés en Algérie sont : Chemlal, Chemlali, Chetoui, Sigoise, Azeradj, Picual, Azeradj, Limli, Bouchouk et Seviane.

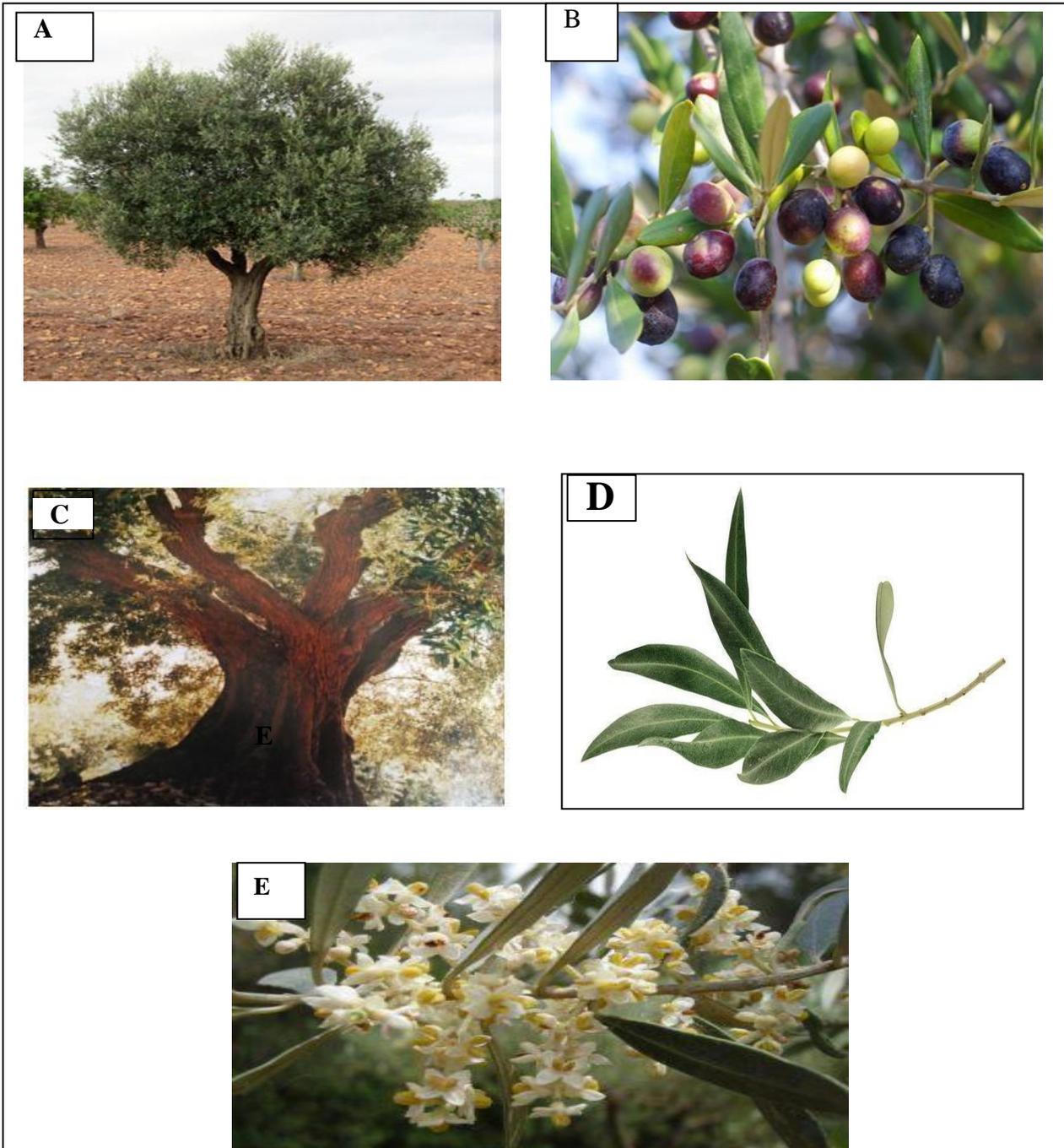


Figure4. Description de l'Olivier *Olea europaea* L.:A: Arbre aspect général ;B: Fruits de l'olivier ; C : Tronc d'olivier (Artaud, 2008) ; D : Feuilles; E : Fleurs.

***Verticillium dahliae* Kleb agent pathogène de la verticilliose de l'olivier**

Maladies de l'Olivier

L'olivier souffre de nombreux déprédateurs et maladies qui limitent la production. Parmi les maladies les plus communes, nous pouvant citer : la tuberculose de l'olivier causée par la bactérie *Pseudomonas syringae* pv *savastanoi*, L'œil de Paon et le flétrissement verticillien causé respectivement par les champignons *Cyclonium oleaginum* Cast. Et le *Verticillium dahliae* Kleb.

Flétrissement verticillien causé par *Verticillium dahliae* Kleb.

L'une des maladies qui constituent une menace pour la production d'olives est le flétrissement verticillien causé par le champignon *Verticillium dahliae* (Jeseničnik et al., 2023). Ce champignon est une espèce hémibiotrophe, transmis par le sol, *V. dahliae* est responsable de pertes économiques pour 200 espèces hôtes dans le monde. Ce pathogène provoque non seulement la mortalité des arbres et une diminution des rendements, mais il affecte également les propriétés organoleptiques des olives, ce qui a un impact négatif sur la valeur commerciale de l'huile d'olive sur le marché (Landa et al., 2019).

Symptomatologie:

Les symptômes du flétrissement verticillien de l'olivier peuvent varier en fonction du stade de l'infection et des conditions environnementales. Cependant, certains symptômes courants associés au flétrissement verticillien de l'olivier comprennent (Fig. 5) (Mamalis et al., 2023) :

- **Flétrissement** : Les arbres affectés peuvent présenter un flétrissement, c'est-à-dire que les feuilles d'une ou plusieurs branches ou de l'arbre entier s'affaissent et perdent leur turgescence, même lorsque le sol est suffisamment humide. Jaunissement et enroulement : Les feuilles peuvent jaunir ou bronzer, souvent à partir des bords ou entre les nervures, ce qui les fait s'enrouler. Le jaunissement peut progresser vers le haut à partir des feuilles inférieures.
- **Croissance rabougrie** : Les arbres infectés par le flétrissement verticillien de l'olivier peuvent présenter une croissance et une vigueur générale réduites.
- **Nécrose** : Dans certains cas, les arbres infectés peuvent présenter des zones nécrotiques sur les feuilles ou les tiges, ce qui peut entraîner une défoliation prématurée.

- **Décoloration vasculaire** : Lorsqu'on réalise une coupe transversale d'une tige infectée, on remarque une décoloration brune à brun foncé dans les tissus vasculaires.
- **Flétrissement unilatéral** : Dans certains cas, un seul côté ou une seule branche de l'arbre peut présenter un flétrissement, tandis que l'autre côté reste relativement intact.
- **Lésions jaunes en forme de V** : Sur certaines feuilles, on peut observer des lésions jaunes en forme de V pointant vers la base de la feuille.
- **Séchage des branches** : Au fur et à mesure que la maladie progresse, des branches entières peuvent se dessécher et les feuilles peuvent rester attachées même si elles sont mortes.



Figure5. Symptômes du flétrissement verticillien chez les oliviers (Rhouma et *al.*,2023).

Cycle biologique et épidémiologique de la maladie

Le cycle de vie et l'épidémiologie du flétrissement verticillien de l'olivier impliquent plusieurs étapes et facteurs contribuant à l'établissement et la propagation de la maladie (Fig. 6).

Verticillium dahliae est un champignon tellurique qui infecte les plantes par les racines et colonise le xylème, provoquant un flétrissement vasculaire. Il peut persister plusieurs années dans le sol sous forme de microsclérotés. Les sources d'inoculum sont les débris végétaux infectés, les résidus de culture ou les mauvaises herbes (Santos-Rufo et al., 2022).

Les températures du sol entre 20 et 30°C favorisent le développement de la maladie. Une humidité excessive du sol facilite également la croissance du champignon et l'infection racinaire (Santos-Rufo et al., 2022).

La sensibilité des oliviers varie selon les variétés, certaines étant très sensibles tandis que d'autres présentent une résistance partielle ou une tolérance au pathogène (Markakis et al., 2022).

Les principaux facteurs influençant l'épidémiologie sont donc la présence d'inoculum dans le sol, les conditions de température et d'humidité propices ainsi que la sensibilité variétale des oliviers.

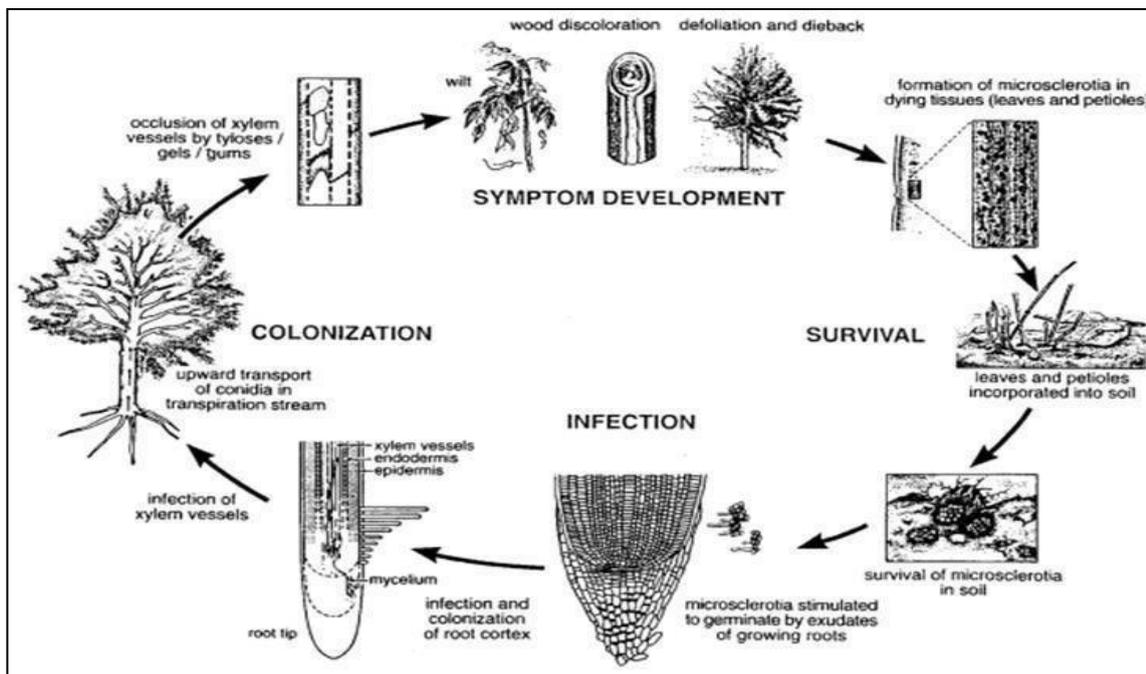


Figure6 .Cycle biologique de *Verticillium dahliae* (Rhoumaet al.,2023).

Taxonomie de l'agent causal

Verticillium dahliae Kleb. Appartient au royaume *Eumycota*, phylum des *Ascomycota*, sous-phylum des *Pezizomycotina*, classe des *Sordariomycetes*, sous-classe des *Hypocreomycetidae*, ordre des *Glomerellales* et la famille des *Plectosphaerellaceae*.

Description de l'agent pathogène *Verticillium dahliae* Kleb:

Verticillium dahliae est un champignon ascomycète imparfait appartenant à l'ordre des Moniliales (Fig.7). C'est un champignon microscopique produisant des hyphes cloisonnés, fins et ramifiés (Pegg et Brady, 2002).

En culture, il produit trois types de structures:

- Un mycélium septé de couleur blanche à beige composé d'hyphes de 1,5 à 3 µm de large (Ploetz et Freeman, 2009).
- Conidiophores hyalins, plus ou moins dressés, ramifiés en verticilles de 3 - 4 phialides par noeud,
- Conidies hyalines, unicellulaires, ellipsoïdales à subcylindriques (Leur durée de vie est limitée)
- Quatre phialides par noeud, conidies hyalines, unicellulaires, ellipsoïdales à subcylindriques, 2,5-8 x 1,4 - 3,2 µm. Forme des microsclérotos hyalins bruns, sombres ou noirs (Ellis, 1971 ; BejaranoAlcázar et al., 1995).
- Des microsclérotos noirs (Fig11.B), sphériques ou ovales, compactes, de 10 à 90 µm de diamètre, constituant les organes de conservation et de dissémination du champignon (Tjamos et Fravel, 1997).

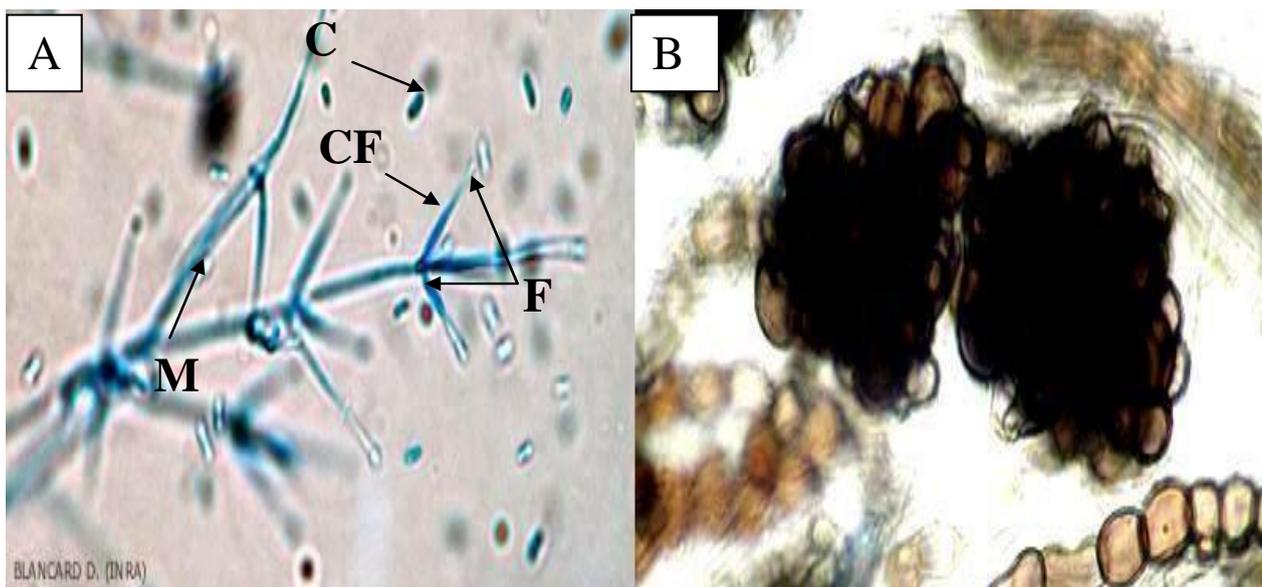


Figure 7 : Photomicrographie de *V. dahliae* : A : Aspect microscopique général du champignon, A:40X (CF=conidiophores, F=phialides, C=conidies, M=mycélium); B : Colonie de microsclérotos, A : 40X. (Blancard, 2024).

Lutte contre la maladie

Verticillium dahliae est un organisme nuisible réglementé de quarantaine de la liste A2, qui nécessite une tolérance zéro dans toutes les opérations d'échange commerciaux de plants d'olivier à l'intérieur du territoire national.

Devant la complicité du pouvoir pathogène de ce pathogène, il est préférable, de produire des plants sains d'olivier à partir des plans mères sains par la production des plants d'oliviers certifiés en respectant toutes les étapes de la certification recommandée par l'OEPP pour l'obtention des plants d'olivier certifiés.

D'autres pratiques ont recommandé comme par exemple, d'arrêter les pratiques de gaulage, introduire des gènes de résistance à la maladie, l'utilisation des microorganismes antagonistes et les traitements chimiques sont largement utilisés pour combattre la maladie en utilisant des produits chimiques efficaces contre cette maladie.

La fumigation du sol peut être rentable lorsqu'elle est utilisée pour protéger les cultures de grande valeur, mais elle est trop coûteuse sur de grandes surfaces. L'inactivation thermique par solarisation du sol s'avère utile pour lutter contre *Verticillium* dans les régions où les températures estivales élevées et de faibles précipitations. De même, l'utilisation de paillis noir avec fertilisation à l'azote ammoniacal semble réduire les dégâts causés par *Verticillium* sur certaines plantes (Agrios, 2005).

Rechercher des gènes de résistances à cette maladie auprès des plantes à intérêt agricole et rechercher des molécules qui bloquent les récepteurs de certaines protéines qui participent dans le processus de pathogénicité de l'agent pathogène (Agrios, 2005).

Interaction hôte-pathogène

L'étude des interactions hôte-pathogène est cruciale pour comprendre les mécanismes qui sous-tendent le développement des maladies et pour élaborer des stratégies de lutte efficaces. Dans le cas de *Verticillium dahliae*, un champignon pathogène qui provoque le flétrissement vasculaire chez un large éventail de plantes hôtes, les interactions avec son hôte impliquent une interaction complexe de processus moléculaires. Il s'agit notamment de la reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) par les récepteurs de reconnaissance des motifs (PRR) de l'hôte, ainsi que de la sécrétion d'effecteurs par le pathogène pour manipuler les processus cellulaires de l'hôte. Il est essentiel de comprendre

Ces interactions au niveau moléculaire pour élucider les mécanismes de résistance et de sensibilité aux maladies (Yu et *al.*,2022).

Interactions spécifiques entre l'hôte et le pathogène *Verticillium dahliae* par l'intermédiaire des protéines Serine/Thréonine kinase

En étudiant les interactions spécifiques entre l'hôte et le pathogène *Verticillium dahliae* par l'intermédiaire des protéines S/T kinase, nous souhaitons faire la lumière sur les mécanismes moléculaires qui sous-tendent le développement de la maladie et la défense de l'hôte (Chandorkar et al., 2021). Les études sur les mécanismes de cette protéine S/T kinase peuvent fournir des informations précieuses pour le développement de nouvelles stratégies de lutte contre le flétrissement verticillien et d'autres maladies des plantes. Grâce à une compréhension globale de ces interactions, afin de contribuer au développement d'approches durables et respectueuses de l'environnement pour la gestion des maladies en agriculture (Tong et Feng, 2022).

Structure et Fonction des Protéines Serine/Thréonine kinase

Les protéines sérine/thréonine kinases (protéines S/T) jouent un rôle essentiel dans la régulation de nombreux processus cellulaires en phosphorylant d'autres protéines, modifiant ainsi leur activité et leur fonction. Elles forment des réseaux complexes de signalisation cellulaire, étant elles-mêmes souvent régulées par la phosphorylation. Comprendre leur structure et leur fonction est crucial pour élucider leur rôle potentiel dans la pathogénèse de *Verticillium dahliae* et pourrait permettre de développer de nouvelles stratégies pour lutter contre cette maladie (Fages et Molina, 2022). Les protéines S/T ont des sites de liaison à l'ATP et des résidus sérine et thréonine servant de sites de phosphorylation, et régulent des processus comme la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire (Fernandez et Ruiz, 2022).

Chapitre II :
Matériels et
méthodes

II. Matériel et Méthodes

Objectif, lieu et période d'étude

Ce présent travail consiste à faire une étude et une contribution sur la maladie du flétrissement verticillien ou la verticilliose de l'olivier causée par le champignon *Verticillium dahliae* Kleb en Algérie. Cette étude a été réalisée dans le laboratoire central du Centre national de contrôle et de certification des semences et des plantes (CNCC) à Alger, sur une période de 5 mois allant du mois de février jusqu'au mois de juin 2024. Le CNCC est une EPA (Établissement public à caractère administratif), créée par décret exécutif n° 92-133 du 28 mars 1992. Il est placé sous la tutelle du ministère de l'Agriculture et du Développement rural (MADR). Il a pour mission principale le contrôle et la certification des semences et des plants et la gestion du catalogue officiel des espèces et variétés des plantes cultivées.

Superficies et situation géographique

Les cinq wilayas prospectées se situent dans la partie nord de l'Algérie. Les zones prospectées est la commune d'Ahmar El Ain et d'Ouled d' Aiche qui se trouvent respectivement dans les wilayas de Tipaza et de Blida. En suite, nous avons visité la commune Bouchetata dans la wilaya de Skikda et la wilaya de bordj Bou Arreridj (Fig.8).

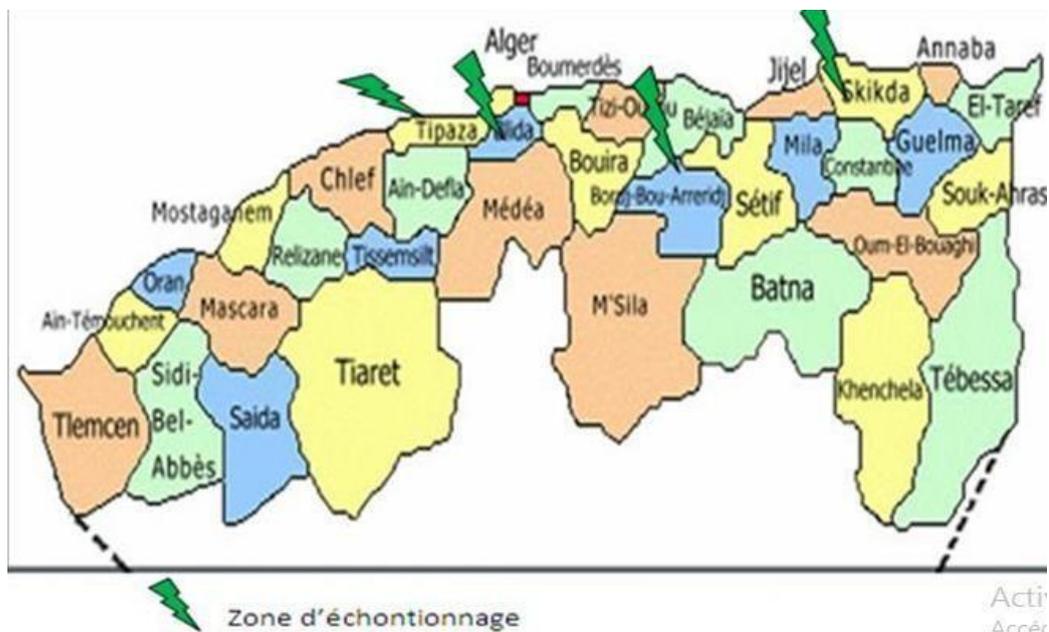


Figure 8. Carte de la wilaya de Tipaza et Blida et bordj-bou- Arredij et Skikda montrant les zones d'échantillonnages

Prospection et récolte des échantillons présentant les symptômes de la verticilliose

Durant les mois de février et mars de la campagne agricole 2023-2024, nous avons prospecté des périmètres agricoles de la zone d'échantillonnage connue pour l'implantation des vergers oléicoles. Des prospections ont été effectuées dans des vergers oléicoles de cinq wilayas de la région Centre et Est de l'Algérie.

Ces wilayas ont été sélectionnées pour leur importance dans la production de l'olivier : Alger, Blida, Tipaza, Bordj Bou Arreridj et Skikda. Quatre vergers ont été échantillonnés dans chaque zone. (Fig. 9).

Ces zones échantillonnées se situent dans le nord de l'Algérie dont le climat est de type méditerranéen, se caractérisant par un été chaud et sec et un hiver frais et humide. À cet effet, nous avons prélevé des jeunes tiges et rameaux sèches et flétris de l'olivier présentant le symptôme typique de la maladie du verticilliose.

Nous avons collecté cinq (05) échantillons dans les différentes wilayas prospectées. Chaque échantillon ou le matériel d'essai (tiges et rameaux) prélevés sont mis dans des sacs en Kraft, marqués par un marqueur : le lieu et la date de prélèvement, la variété et l'âge de l'arbre échantillonné. Les échantillons sont transportés au laboratoire de mycologie du CNCC et stockés à la température ambiante du laboratoire pour analyse (Fig. 9).



Figure9.Echantillonnages des matériaux d'essais présentant les symptômes de la verticilliose de l'olivier (Photo originale :2024).



Figure10. Arbre d'olivier d'essais présentant le symptôme de la verticilliose dans wilaya de Tipaza.

II.4.1. Conservation des échantillons

Les échantillons de tiges et rameaux flétris d'olivier sont conservés à 4° C, dans le réfrigérateur pour des analyses ultérieures au laboratoire.

Matériels utilisés dans notre étude

II.5.1. Matériels biologiques

Le matériel biologique utilisé dans notre étude, des jeunes tiges et rameaux sèches et flétris de l'olivier présentant le symptôme typique de la maladie du verticilliose. Elles ont été sélectionnées pour l'ensemble des tests microbiologiques pour l'isolement des isolats *Verticillium dahliae*.

Autres matériels et consommables utilisés

Lors de nos différentes manipulation au laboratoire du CNCC, nous avons utilisé le matériel et le consommable suivant: Boîtes de Petri, casserole, verrerie, tubes à essai ,flacon, loupe binoculaire, micropipettes, Ethanol, balances, autoclave, eau distillée, incubateur, hotte à flux laminaire, bec benzène, hypochlorite de sodium (NACIO) à 12°, agitateur, scalpel, pince et ciseau, coton et papier filtre, étuve pour la stérilisation de la verrerie et le papier filtre, réfrigérateur et congélateur (pour la conservation des produits, réactifs et des matériaux d'essais (isolats et échantillons), incubateur et distillateur.

II .6. Méthode

II .6.1. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture utilisé (Fig. 11) dans nos essais est le milieu solide PDA (Potato Dextrose Agar), c'est le milieu organique de base le plus largement utilisé pour cultiver un grand nombre d'espèces fongiques de champignons (Rapilly, 1991).

Le milieu de culture PDA est constitué de:

- 200 g de pomme de terre.
- 20 g de glucose.
- 20 g d'agar.

Les pommes de terre sont épluchées, coupées en tranches, mises à cuire dans 1000 ml d'eau distillée. Le filtrat de jus de pomme de terre obtenu est ajouté au glucose et à l'agar. Le volume du milieu est rapporté à 1000 ml, le tout est autoclave à 120 °C pendant 20 minutes. La préparation du milieu de culture PDA se fait selon le mode opératoire suivant :

- Lavez et pesez les pommes de terre et coupez-les en petits morceaux. Faites-les bouillir pendant 15 à 20 minutes jusqu'à ce qu'elles soient tendres.
- Écartez les pommes de terre, mais gardez l'eau de cuisson.
- Ramenez le niveau de l'eau de cuisson à exactement 1 litre en ajoutant de l'eau distillée.
- Ajoutez le dextrose et l'agar.
- Chauffez doucement en remuant jusqu'à ce que l'agar ait fondu. L'agar doit être chaud quand on le verse dans les éprouvettes ou les flacons pour éviter la formation de grumeaux.
- Remplissez les récipients jusqu'au quart environ, puis fermez hermétiquement les éprouvettes et les flacons avec un tampon de coton.
- Autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes.
- Après refroidissement, le milieu est réparti dans des boîtes de Pétris ou dans des tubes à essai.



Figure11.Préparation de milieu de culture PDA

II .6. 2. Isolement et purification des isolats

En mycologie, les techniques d'isolement sont très nombreuses et sont choisies en fonction de la localisation du pathogène que l'on désire mettre en évidence (Neergaad, 1973). Nous avons coupé les rameaux et l'écorce en petits morceaux et en petits fragments, qui ont été désinfectés par l'hypochlorite de sodium titré à 2% pendant 5 à 10 minutes, puis plongés dans 3 bains successifs d'eau distillée stérile pendant 5 minutes. Une fois séchés sur papier filtre, ils sont déposés dans une boîte de Pétri contenant du milieu PDA (5 fragments par boîte) et mis à incuber sous une lumière continue à température de 20 °C. Pour bien illustrer cette technique, voici quelques photos prises lors des isolements faits au sein du laboratoire de mycologie au niveau du Centre national de contrôle et de certification des semences et des plants (CNCC) (Fig. 12).



Figure12 .Protocole d'isolement des isolats de *Verticillium dahliae*

II .6. 3.1. Purification des champignons

II .6. 3.1.1. Purification par repiquages successifs

Dès l'apparition des jeunes colonies ayant l'aspect culture cotonneux, celles-ci ont repiquées successivement sur milieu PDA et en condition d'aseptise (Fig.13).



Figure13 . Purifications des espèces fongiques obtenues lors des opérations d'isolements

II .6. 3.1.2. Purification par culture monospore

À partir d'une culture pure de *Verticillium dahliae*, on prélève un fragment de 1 cm² qu'on met dans un tube contenant 10ml d'eau distillé stérile et on agite. La concentration en spores de la solution est calculée à l'aide d'une cellule Malassez.

Par la formule $C1 V1=C2 V2$

C1 : La concentration initiale du soluté (avant dilution).

V1 : Le volume initial du soluté (avant dilution).

C2 : La concentration finale du soluté (après dilution).

V2 : Le volume final du soluté (après dilution).

La concentration finale de la suspension de spores de *V. dahliae* est ajustée à la concentration 3.102 spores/ml. Puis on étale une goutte de 50 µl à la surface d'une boîte de Pétri contenant un milieu PDA pauvre, c'est-à-dire contenant 2 g de glucose. Ces boîtes sont mises en incubation à 20 °C pendant 2 jours au minimum.

Après incubation sous une lumière blanche continue, on observe sous loupe binoculaire de petites conidies en germination dont on repique une sur un milieu de culture PDA.

II .6.4.Identification des isolats de *Verticillium dahliae*

L'identification des isolats obtenus c'est basée sur les caractères morphologiques du champignon et l'aspect cultural (la couleur des colonies, l'aspect du mycélium et la Pigmentation), sur le milieu PDA.

À cet effet, les caractéristiques d'évaluation retenues dans notre étude sont :

- Les observations macroscopiques des colonies
- Les observations microscopiques
- La croissance mycélium sur le milieu PDA.
- Les caractères morphologiques des colonies
- La taille des conidies
- La production des conidies

II .6.4.1.Observation macroscopique

L'observation macroscopique est une étape très importante pour la caractérisation des espèces fongiques. Elle se fait généralement à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire pour voir les caractères culturaux des champignons, à savoir la couleur de la colonie fongique, la présence ou l'absence des spores, la couleur et la forme des spores et la présence ou l'absence des conidiospores (Fig.14).

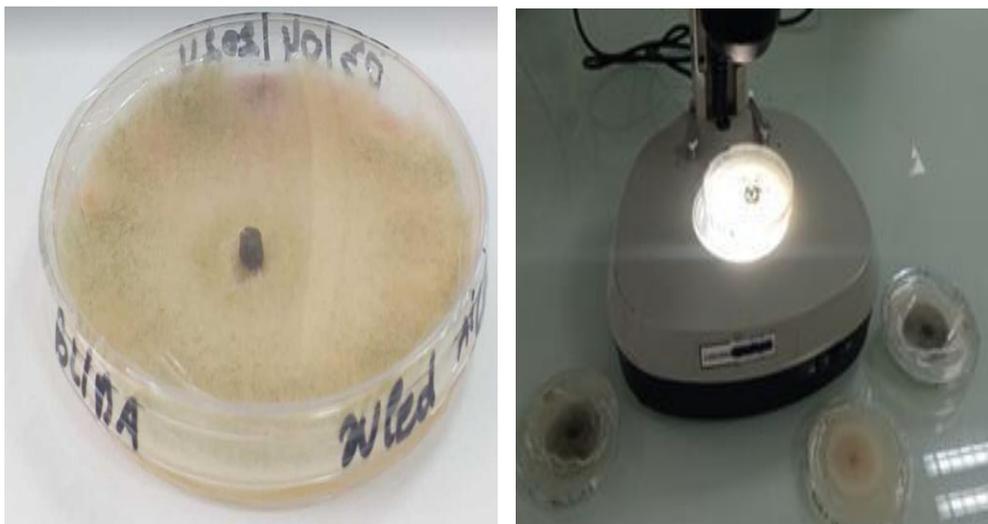


Figure14.Observation macroscopique des colonies

II .6. 4.2. Observation microscopique

L'observation microscopique des préparations entre lame et lamelle se fait généralement par un microscope photonique à différents grossissements (X4, X10, X25 et X40) pour visualiser les différents caractères cellulaires qui peuvent être distingués entre les genres des espèces fongiques. Ces observations vont nous permettre d'identifier, si possible, le genre de l'espèce fongique isolée, aidé par la clé de détermination des champignons utilisés dans notre étude, à savoir l'ILLUSTRATED GENERA IMPERFECT FUNGI (Barnett et Hunter, 1978). Les caractères cellulaires qui distinguent les champignons et quand doit-on les prendre en considération, sont en général la forme et la couleur des spores, la présence ou l'absence de mycélium cénocyte-tique hyalin ou coloré, la présence ou l'absence de mycélium septe hyalin ou coloré et la présence ou l'absence des fructifications sexuées ou asexuées (Fig.15).



Figure15. Observation microscopiques sur lame et lamelle à l'aide d'un microscope photonique

II .6. 5.1. Caractérisation morphologique des isolats

II .6. 5.1. Mesure de la croissance mycélienne des isolats

Généralement, la croissance mycélienne chez les champignons est évaluée par deux méthodes : soit par la mesure de la croissance linéaire et diamétrale des colonies, soit par la mesure du poids sec. Dans notre cas, nous avons retenu la première, utilisée par Kaiser(1973). La croissance linéaire des isolats de *V. dahliae* a été évaluée par la mesure de l'accroissement mycélien au cours du temps d'un explantât mycélien initial mesurant 5 mm de diamètre au moment du repiquage selon la formule : $L=D-d/2$

L=croissance linéaire

D : Diamètre de la colonie

d: diamètre initial de l'explant

- La vitesse moyenne de croissance de chaque isolant a ensuite été calculées la forme
- Les explants sont prélevés à l'aide d'un emporte-pièce stérile à partir de cultures jeunes de 7 jours.
- Ils sont ensuite disposés au centre des boîtes de pétri contenant le milieu de culture PDA.
- Pour chaque isolat, nous avons réalisé 3 répétitions l'ensemble des boîtes est mise à incuber à la température du laboratoire et sous lumière blanche continue.

II .6. 5.2. Mesure de la sporulation

Elle a été évaluée à partir d'une culture âgée de 10 jours, obtenue dans le milieu PDA. La technique utilisée consiste à laver avec 10 ml d'eau distillée stérile, l'ensemble des boîtes de pétri contenant le champignon, afin de libérer toutes les spores. La suspension de spores est ensuite versée dans un bécher où on complète le volume avec de l'eau distillée stérile à 50 ml. De chaque suspension conidiénne ainsi préparée, on prélève 4 à 5 échantillons de 0,1 ml ; ils sont examinés à l'aide de la cellule de Malassez sous microscope optique. On compte le nombre de conidies pour chaque échantillon.

II .6. 5.3. Mesure in vitro des conidies des isolats de *V.dahliae*

La mensuration des conidies est réalisée sur des cultures âgées de 10 jours, obtenues sur le milieu PDA, à une température comprise entre 18 et 20°C, sous lumière continue. Cette étude a porté sur la longueur et la largeur de 50 conidies par isolat ; elle est réalisée à l'aide d'un microscope préalablement étalonné. La suspension des spores a été réalisée dans un liquide neutre : l'eau. Le mode opératoire consiste à déposer entre lame et lamelle une goutte de suspension conidiénne qu'on observe au grossissement (10 x100).

II .7.Analyse bioinformatique

II .7.1.Matériels

L'étude bioinformatique, nécessite l'utilisation d'une connexion internet à haut débit afin de pouvoir consulter des bases de données à accès libre (Tab.1) qui nous permettent d'analyser notre gène et notre protéine, ainsi que la structure tridimensionnelle de la protéine d'intérêt.

Tableau1:bases de données utilisées

Base de données	URL
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=verticillium+dahliae++vlds.17
UniProt	https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A444RZ68/entry
SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org/interactive

II .7.2.Méthodes

II .7.2.1.Recherche de la séquence de la protéine d'intérêt

- Effectuer une recherche dans les bases de données de séquences protéiques, comme UniProt ou NCBI, pour trouver la séquence de la protéine thréonine protéine kinase de *Verticillium dahliae*.
- Télécharger la séquence au format FASTA(Fig.16).

```

serine/threonine-protein kinase CLA4 [Verticillium dahliae VdLs.17]
NCBI Reference Sequence: XP_009653548.1
GenPept Identical Proteins Graphics
>XP_009653548.1 serine/threonine-protein kinase CLA4 [Verticillium dahliae VdLs.17]
MANDRSVYSSGQFMNPGPAPRPPTDNRPLALTPNANLPGSMANMAISPIRSTTTSTYTGSTISLPIARQ
NSSQTDGHHGGVAIRKEGWAQVKESKNFINPWKQRLVLRKESLDFHKTGGKVAYTYLYKDVVNVGRVEA
AGTIFEIKRNPNGSSNSPGEDDGQTKTLQIRVKSDDDLYEWIDL IYGACPGMGGVSNPTNFSHAVHVGFD
PQTGEFVGLPPEWSKLLNSSAITKEDYERNPQAVFEVLDYFDLTKRAGNPQQYSSLTPTPPVSSQQNKQ
LGYGNAAGAVAPPRPMPSPQQRQPSYNTQASPSQRKPSASDQQDQMQRQQMQMQETRDRELQQRDQRD
RDAQRHRQMEARQREIDEANRRDLEAYNAAIPTKVPMAQQELGGFGGGSSSPSDRYNPSRAAPPA
PKASNQQVGS LRAQR PAPSPTAGSTRPPLSSQSSSLRDPNQAQRAPRPDPNQRYPNGSSASQPRP
NGPSQAQPSRLPAPVKPLNVNKAPAPQPSDGVKAAEAAALSAKAPASERKQDVRHSTMSEGEVMAKLKEA
VSKDDPNLSYSKQKIGQGASGSVYVAKVKETAQSPITARELLRSQGLKAQVAIQMDLAHQPRKELIVNE
IMVMKDSRHRNIVNFDALFRNNNSLWVMEFHEGGALTDVIDGNTSISEEQISTICLENIIHRDIKSD
NVLLDARGNVKIDTFGFCAKLTESKSKRATMVGTPYWMapevVVKQKEYGPKVDIWSLGIIMAIEMIESEPP
YLNEEPLKALYLIATNGTPRLKKPEKLSKELKAFLSVCLCVDVMSRASAEELLHDFLKHGCPPLSLADL
LAFKKTAK
    
```

Figure16.Format FASTA de la protéine

II.7.2.2. Analyse de la séquence

- Utiliser des outils d'analyse de séquences, comme BLAST(Fig.17), pour rechercher des protéines similaires dans d'autres organismes.

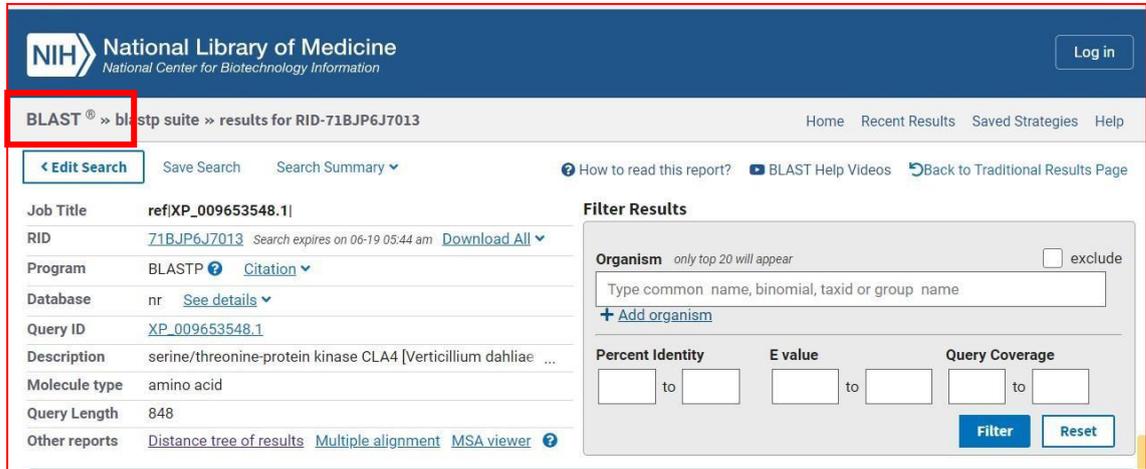


Figure17. L’interface de l’outil d’analyse des séquences BLAST.

II.7.3. Analyse phylogénétique

- Construire un arbre phylogénétique à partir de l'alignement multiple de séquences, en utilisant des méthodes comme le maximum de vraisemblance ou l'inférence bayésienne.
- Visualiser et analyser l'arbre phylogénétique pour étudier les relations évolutives de la protéine d'intérêt avec ses homologues des organismes proches (Fig.18)

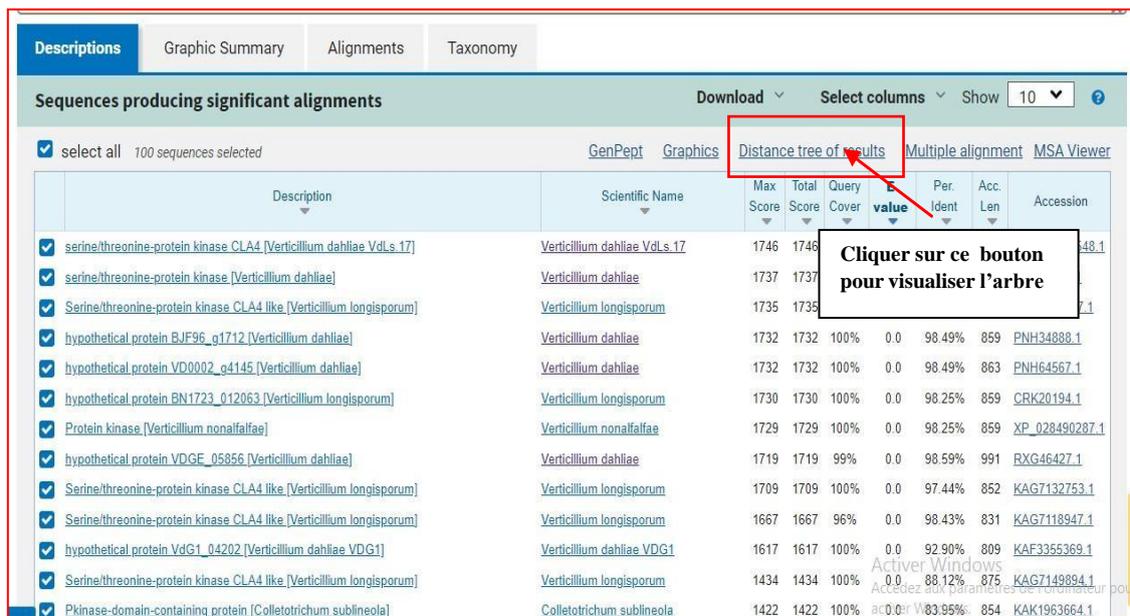


Figure18.L’alignement multiple de séquences de d’autres souches ou d’organismes génétiquement proches.

II.7.4. Alignement multiple de séquences

- Récupérer des séquences homologues de la protéine d'intérêt dans d'autres champignons ou organismes.
- Analyser l'alignement pour identifier les régions conservées et variables de la protéine.
- En utilisant la base de données UniProt ou SWISS-MODEL.

II.7.5. Prédiction de la structure 3D et amarrage moléculaire

- Générer un modèle structural 3D de la protéine à l'aide d'outils de modélisation par homologie sur UniProt ou SWISS-MODEL (Fig. 19).
- Analyser les interactions protéine-ligand et les sites de liaison potentiels.

UniProt Tools UniProtKB serine/threonine protein kinase verticillium dahliae Advanced | List Search

Status: Unreviewed (TrEMBL) (70)

UniProtKB 70 results

BLAST Align Map IDs Download Add New Cards Table Share

G2X6G3 · G2X6G3_VERDV
 non-specific serine/threonine protein kinase · Gene: VDAG_05745 · *Verticillium dahliae* (strain VdLs.17 / ATCC MYA-4575 / FGSC 10137) (Verticillium wilt) · EC:2.7.11.1 · 950 amino acids · Predicted · Annotation score: (45)
 #Kinase #Serine/threonine-protein kinase #Transferase #Autophagy #Protein transport
 #Transport

G2X6S4 · G2X6S4_VERDV
 non-specific serine/threonine protein kinase · Gene: VDAG_05856 · *Verticillium dahliae* (strain VdLs.17 / ATCC MYA-4575 / FGSC 10137) (Verticillium wilt) · EC:2.7.11.1 · 848 amino acids · Inferred from homology · Annotation score: (315)
 #Kinase #Transferase #Pheromone response
 3 domains · 1 publication

Ecrire la protéine d'intérêt

Cliquer ici pour voir les résultats de structure protéine

Figure 19. Interface de la base de données UniProt.

***Chapitre III:
Résultats et
discussion***

III. Résultats et discussion

Obtention des isolats de *Verticillium dahliae*

Sur les trente échantillons collectés sur mes cinq wilayas et communes prospectées : Ahmar El Ain et d'Ouled d' Aiche qui se trouvent respectivement dans les wilayas de Tipaza et de Blida, Bouchetata dans la wilaya de Skikda et la wilaya de bordj Bou Arreridj, les isolements réalisés sur le milieu solide PDA ont permis d'obtenir deux genres d'espèces de champignons telle que l'*Alternaria* spp. et le *Penicillium* spp.. En ce qui concerne le *Verticillium dahliae*, les manipulations microbiologiques effectuées non pas permet d'obtenir des isolats de ce genre d'espèce fongique à partir de tiges et de rameau de plants de l'olivier. Dans nos essais, il s'agit de la technique d'isolement dite classique d'isolement sur milieu de culture PDA qui a permis d'obtenir d'autre champignons pathogènes et saprophytes que le *Verticillium dahliae* (Fig. 20).

Les difficultés inhérentes à l'isolement de *V. dahliae* sur milieu PDA à partir de tiges et de rameau de plants de l'olivier présentant le symptôme typique du flétrissement verticillien de l'olivier pourraient s'expliquer par :

- La faible compétitivité de *V. dahliae* par rapport à d'autres champignons pathogènes, saprophytes et des bactéries qui ce développées sur le milieu de culture utilisé ;
- L'absence totale des antibiotiques lors de la préparation du milieu de culture PDA pour l'isolement de *V. dahliae*. La disponibilité simultanée de plusieurs antibiotique sont importants pour l'obtention de cultures pures de *V. dahliae*;
- Le milieu de culture utilisé dans nos essais, le PDA est considéré comme un milieu de culture non sélectif pour l'isolement de *V. dahliae* ;
- Par contre, le milieu de culture PDA est considéré comme un milieu de culture sélectif pour isoler d'autres espèces fongiques phytopathogènes exemple l'*Alternaria* spp. ;

La technique utilisée lors de l'isolement, sur le milieu PDA sans antibiotiques est jugée non fiable par certains auteurs. En effet, (Rhouma et al., 2023), rapporte que, l'isolement de *V. dahliae* et plus facile à partir des microsclérotas de ce pathogène qui s'agrèges dans le sol par rapport à l'isolement à partir de tiges et de rameau de plants de l'olivier. En revanche, la technique d'isolement de *V. dahliae* à partir du sol est très lourde et nécessite un milieu sélectif et un jeu d'antibiotiques.

Identification conventionnelle des isolats obtenus

Observations macroscopiques

L'observation des colonies fongiques à l'aide d'une loupe binoculaire a permis d'étudier les caractéristiques culturales des pathogènes obtenus, telles que la couleur de la colonie, la présence ou l'absence de spores, leur couleur et leur forme, ainsi que la présence ou l'absence de conidiospores. Sur la base de ces observations, notamment de la couleur de la colonie et de la forme des spores, deux genres ont pu être identifiés parmi les espèces fongiques isolées à partir de tiges et de rameau de plants de l'olivier présentant le symptôme typique du flétrissement verticillien de l'olivier.



Figure 20. Colonies fongiques obtenues lors des isolements réalisés à partir de tiges et de rameaux de l'olivier sur milieu PDA

Les isolats obtenus sur le milieu PDA forment un mycélium cotonneux, vert ou brun clair à la surface. Les colonies sont circulaires et les marges varient en couleur et en largeur (Fig. 21).

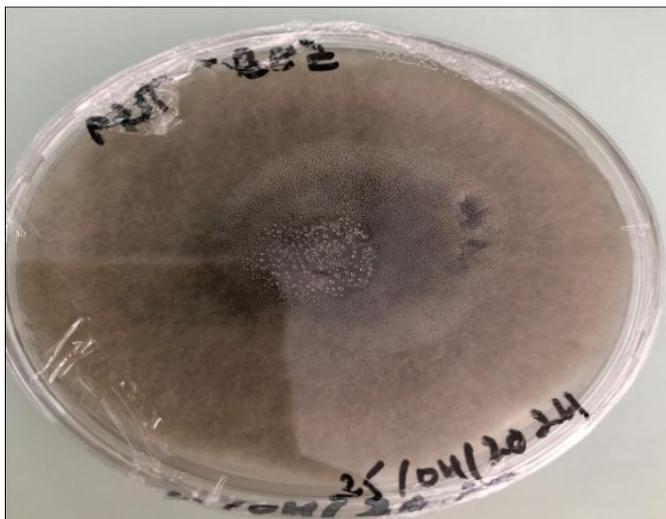
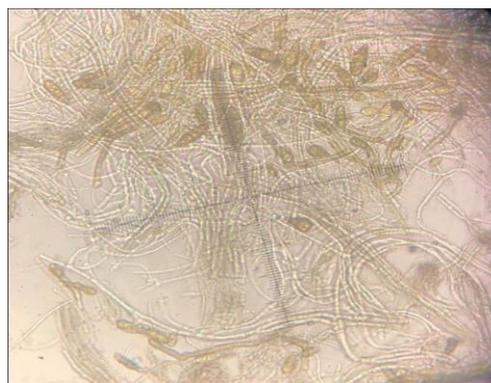
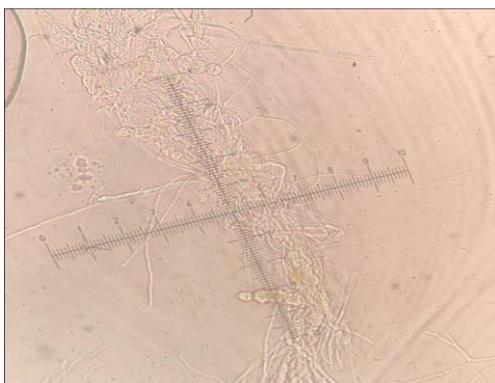


Figure 21. Aspect cultural d'un champignon le *Penicillium spp* obtenu lors des isolements réalisés à partir de tiges et de rameaux de l'olivier sur milieu PDA.

Observations microscopiques

L'observation microscopique des préparations des isolats, à différents grossissements (X40, X100, X250 et X400), a permis de visualiser les différents caractères cellulaires permettant de distinguer les genres des espèces fongiques. L'utilisation de la clé de détermination des champignons de Barnett et Hunter (1978) a conduit à l'identification d'un seul genre d'espèce fongique pathogène en l'occurrence *Alternaria spp.* isolé à partir à partir de tiges et de rameaux de l'olivier sur milieu PDA (Fig. 22).

Les isolats de *Alternaria spp.* Sur le milieu PDA forment des conidies seules ou en chaînes de 2 ou 3 sur des conidiophores septés le plus souvent non ramifiés, d'une longueur allant de 90 à 160 ($126,67 \pm 18,2$) μ m. Les conidiophores étaient typiquement de couleur brune et de forme obclavée (Fig. 28 (A, B, C, D)). Le nombre de septa transversaux et longitudinaux des conidies varie de 3 à 16 et de 0 à 5, respectivement.



A : Mensuration microscopique des conidies d'*Alternaria* spp G X 100

B : Conidies en chaine d'*Alternaria* spp GX 250



C : Conidie d'*Alternaria* spp GX400

D : Conidie d'*Alternaria* spp G X 350

Figure 22 .Aspects microscopiques des conidies et conidiophores de l'*Alternaria* spp sur le milieu PDA

Etude bioinformatique g n  in Silico.

Identification de Gene VDAG_05856 sérine /thréonine protein kinase (*Verticilliumdahliae* VdLs.17)

Nous avons collecté les informations suivantes sur la baes de données NCBI :

- Le gène VDAG_05856 est localisé sur le chromosome 4 situé entre 675581 et 691037 pb, celui-ci est composé de 3 exons (Fig. 23).

- le nombre nucléotides du gène VDAG_05856 qui sont transcrits en ARN messenger (ARNm) selon nos résultats est de 2,547 bp (Fig. 24).
- Nous avons pu déterminer la taille de la protéine sérine /thréonine CLA4 qui est composé de 848 acides aminés (Fig. 25).

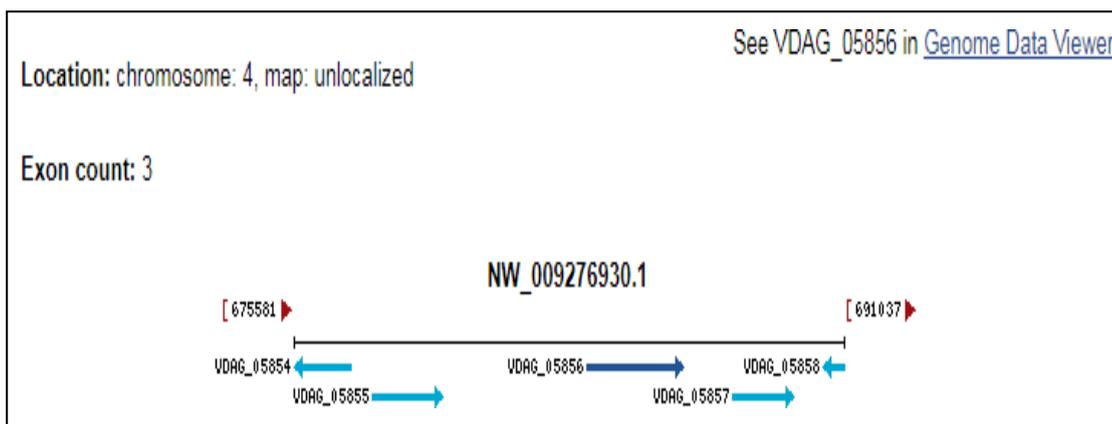


Figure 23 La position du gène VDAG_05856 (NCBI Gene)

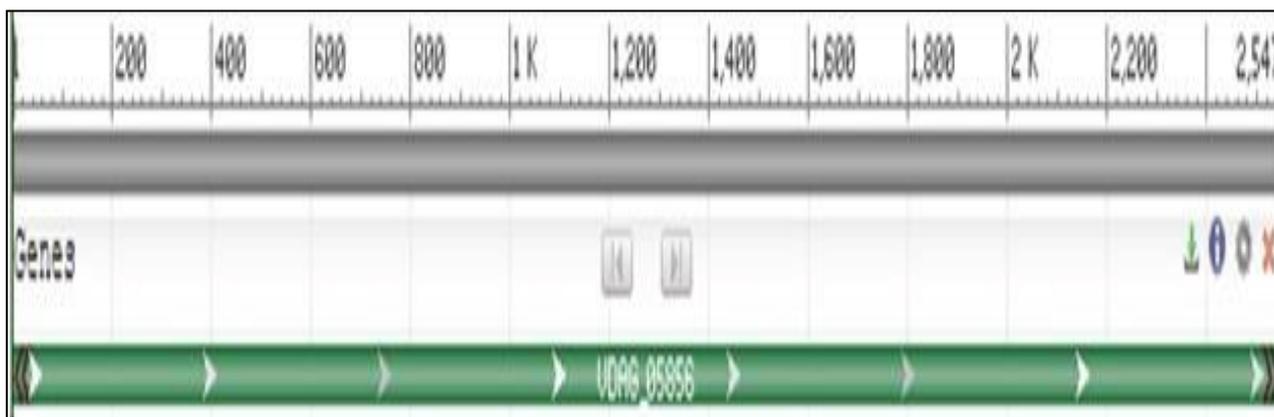


Figure 24.le nombre de nucléotide dans ARNm dans gène VDAG 05856. (NCBI nucléotide)

L'alignement des séquences des acides aminés de la protéine sérine/thréonine kinase CLA4 permet de comparer sa structure avec celles de protéines similaires. En utilisant Swiss-Model , cet alignement aide à prédire la structure tridimensionnelle de CLA4, en mettant en évidence les régions conservées, comme les sites de phosphorylation. Cela permet d'étudier son rôle dans la régulation du cytosquelette et la division cellulaire, et d'analyser les mutations possibles qui pourraient affecter sa fonction.

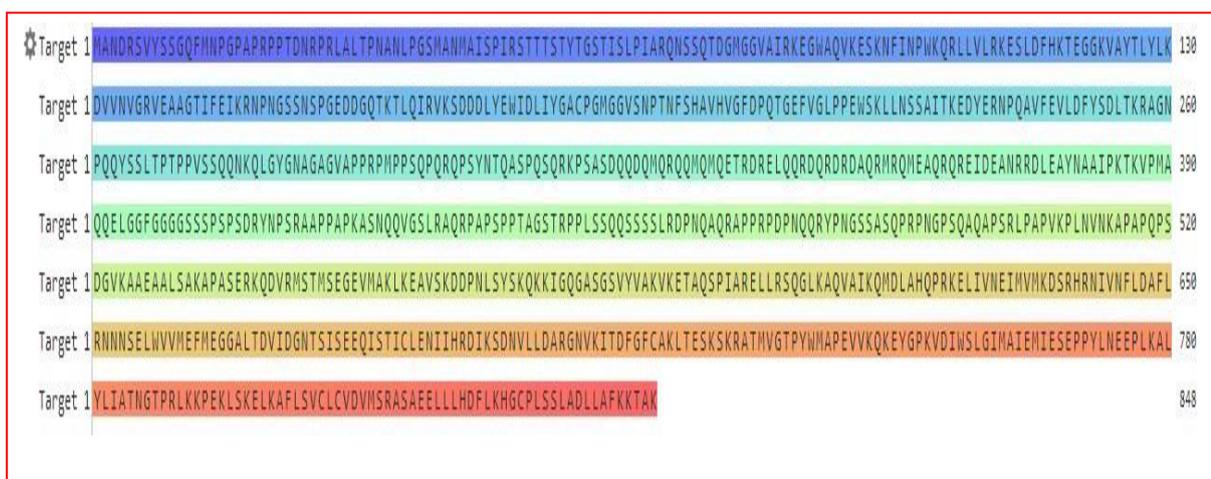


Figure 25 . Alignement des séquences des acides aminés de la protéine sérine /thréonine kinase CLA4 (Swiss-model).

Etude de la variabilité génétique intra -spécifique concernant le gène

Afin de déterminer la variabilité intraspécifique concernant le gène VDAG_05856 sérine/thréonine protein kinase chez les autres espèces du genre *Verticillium*

L'analyse de l'arbre phylogénétique (Fig.26) a révélé que les séquences du gène codant pour la protéine sérine/thréonine kinase de différentes souches de *Verticillium nonalfalfae* sont étroitement liées à celles de *V. dahliae* (souche VdLs.17), indiquant une proximité phylogénétique entre ces deux espèces.

Les résultats de notre analyse de survie globale indiquent que l'étude des données de transcription pour 10 535 gènes et la séquence génomique de 33,8 Mb de *V. dahliae*, souche VdLs.17 (base de données du groupe *Verticillium* du Broad Institute), a révélé ce qui suit :

En comparant le génome de la souche *V. dahliae* VdLs.17 à celui de la souche *Verticillium alfalfae* VaMs.102, quatre régions spécifiques à une lignée (LS) d'environ 350 kb de longueur sont présentes dans VdLs.17 mais absentes dans la souche VaMs.102. Ces régions VdLs.17 LS

codent pour 354 gènes, dont certains ont été liés à la virulence et à la spécificité de la gamme d'hôtes (Klosterman et *al.*, 2011).

Bien qu'il soit impossible de distinguer *V. nonalfalfae* de *V. alfalfae* morphologiquement, ils diffèrent par leur gamme d'hôtes et leurs caractéristiques d'ADN (Inderbitzin et *al.*, 2011).

Marton et *al.* (2018) ont utilisé la base de données MEROPS pour comparer les protéines sécrétées potentiellement par *V. nonalfalfae* aux peptidases. Ils ont identifié :

- 12 peptidases aspartiques exprimées in planta.
- 2 peptidases à cystéine.
- 27 métallopeptidases.
- 44 peptidases à sérine
- 1 peptidase à thréonine.

Les peptidases putatives sécrétées par les espèces de *Verticillium* phytopathogènes ont été comparées : *V. nonalfalfae*, *V. alfalfae* et *V. longisporum* présentaient une distribution comparable des peptidases, tandis que *V. dahliae* présentait une distribution statistiquement différente des métallopeptidases, des cystéines et des sérines peptidases.

Klosterman et *al.* (2011) ont fourni des séquences génomiques de cinq espèces de *Verticillium* (*V. dahliae*, *V. alfalfae*, *V. tricorpus*, *V. longisporum* et *V. nonalfalfae*) et de leurs souches, offrant une richesse d'informations génomiques pour diverses études.

Ils ont étudié les génomes de *V. dahliae* (souche VdLs.17) et de *V. alfalfae* (souche VaMs.102) pour détecter des effecteurs potentiels et d'autres protéines sécrétées en fonction de la localisation subcellulaire et de la présence d'un peptide signal. Un nombre similaire de protéines sécrétées a été trouvé dans les deux génomes (780 et 759 pour *V. dahliae* et *V. alfalfae*, respectivement), et comparable à celui des autres champignons.

Dans le cas de Jelen et *al.* (2016), une comparaison du génome mitochondrial de *V. nonalfalfae* (26 139 pb) avec celui de *V. dahliae* (27 184 pb), étroitement apparenté, a montré des tailles comparables, un ordre des gènes conservé et des modifications nucléotidiques spécifiques à l'espèce, contribuant à un taux de 98,15 % d'identité au niveau nucléotidique entre les génomes mitochondriaux.

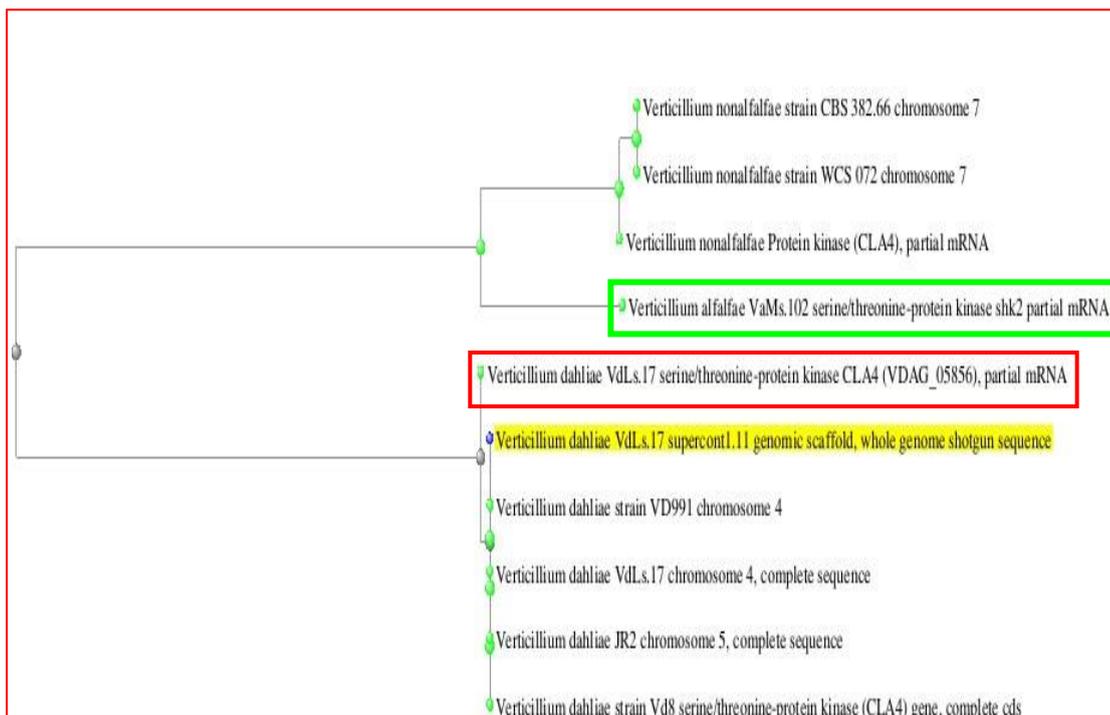


Figure 26 .arbre phylogénétique intraspécifique *Verticillium*

Structure tridimensionnels de la protéine

Au niveau de la plateforme Swiss-model, 7046 modèles ont été trouvés pour correspondre à la séquence cible de notre protéine. Cette liste a été filtrée par une heuristique jusqu'à 50. Les premiers modèles sont les suivants :

Nous avons repéré une protéine sérine/thréonine kinase qui est identique de 99,53 % à la notre (Tab. 2) qui appartient à l'espèce *Verticillium longisporum*.

Tableau II : Pourcentage de similarité entre les structure de la protéine sérine/thréonine kinase et *Verticillium dahliae*, souche VdLs17 :

Template	Sequence Identity	Biounit Oligo State	Description
A0A0G4LE22.1	99.53	monomer	non-specific serine/threonine protein kinase AlphaFold DB model of A0A0G4LE22_9PEZI (gene: A0A0G4LE22_9PEZI, organism: <i>Verticillium longisporum</i>)
6fd3.1	61.35	monomer	Serine/threonine-protein kinase PAK 3 Thiophosphorylated PAK3 kinase domain
3q4z.1	61.70	homo-dimer	Serine/threonine-protein kinase PAK 1 Structure of unphosphorylated PAK1 kinase domain
6fd3.1	59.57	monomer	Serine/threonine-protein kinase PAK 3 Thiophosphorylated PAK3 kinase domain
8x5z.1	62.28	monomer	Serine/threonine-protein kinase PAK 1 The Crystal Structure of PAK1 kinase domain from <i>Biorius</i> .

Description de la structure tridimensionnelle (Fig. 27) de la protéine sérine/thréonine kinase codée par le gène VDAG_05856 chez *Verticillium dahliae*, souche VdLs17 :

Cette protéine appartient à la famille des sérine/thréonine kinases du pathogène fongique *V. dahliae*. Sa structure 3D a été identifiée dans les bases de données UniProt avec les niveaux de confiance de modèle suivants :

- Confiance du modèle : Très élevée (pLDDT>90) : Cela indique que la structure prédite est très précise et fiable. Un pLDDT (Precision-Dependent DT-score) >70 signifie que la structure prédite est probablement correcte.

Rôle potentiel de la protéine sérine/thréonine kinase chez *V. dahliae* :

- Elle peut jouer un rôle important dans les processus liés à la pathogénicité, la morphogenèse et l'agressivité différentielle entre les isolats (Chen et *al.*, 2015).
- Les tendances d'expression de cette kinase lors de l'infection des feuilles détachées sont similaires à celles du traitement à l'extrait de tige, suggérant qu'elle pourrait fonctionner dans un modèle ou une voie de signalisation similaire (Pak et *al.*, 2006 ; Ding et *al.*, 2009).
- Elle régule la différenciation et la prolifération cellulaire.
- Son activité accrue lors de l'exposition à des extraits du processus d'infection indique qu'elle pourrait être impliquée dans la germination des spores et d'autres processus cellulaires conduisant à l'infection par *V. dahliae* (Nantel et *al.*, 2002).

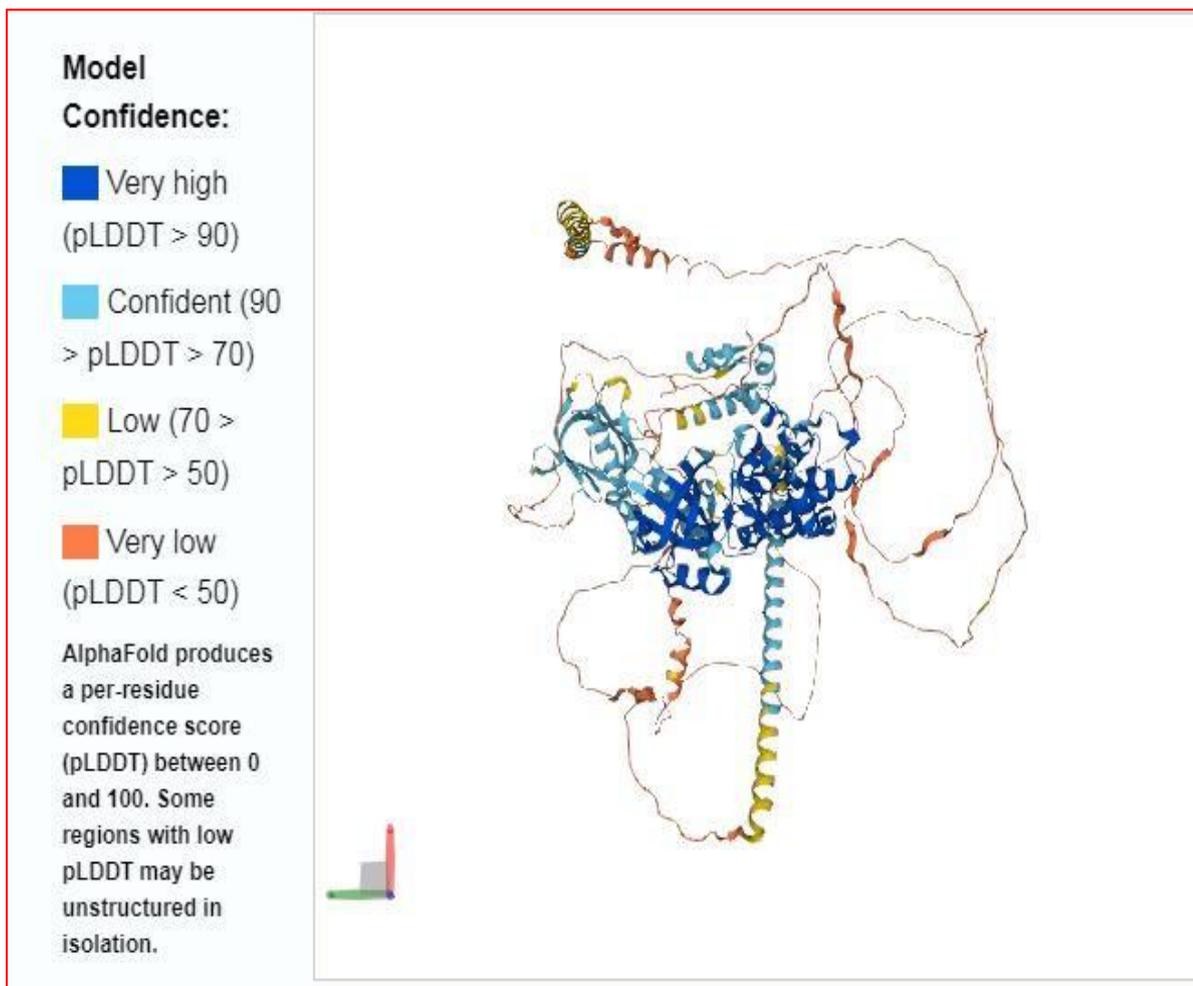


Figure 27. structure tridimensionnel de la protéine (UniProt,2024)

Emplacement subcellulaire de la sérine/thréonine protéine kinase dans cytoplasme

D'après les informations fournies, il semble que la localisation subcellulaire précise de la protéine sérine/thréonine kinase codée par le gène VDAG_05856 chez *Verticillium dahliae* n'ait pas été directement mentionnée dans la base de données NCBI ou autres (Fig. 28).

En revanche, on peut faire les suppositions suivantes ; concernant son emplacement subcellulaire:

Étant une protéine kinase, elle est probablement localisée principalement dans le cytoplasme des cellules fongiques. Les protéines kinases sont généralement des enzymes cytoplasmiques qui jouent un rôle clé dans diverses voies de signalisation intracellulaire en phosphorylant d'autres protéines cibles.

Cependant, il est également possible qu'une partie de cette protéine kinase soit associée à des structures membranaires comme le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi, où elle pourrait réguler des processus comme le trafic vésiculaire ou la sécrétion de protéines.

En l'absence d'informations expérimentales spécifiques sur sa localisation, on peut supposer que la protéine sérine/thréonine kinase VDAG_05856 est principalement cytoplasmique, mais pourrait également être partiellement associée à des membranes intracellulaires, en fonction de son rôle précis dans la régulation des voies de signalisation et des processus cellulaires chez *V. dahliae*.

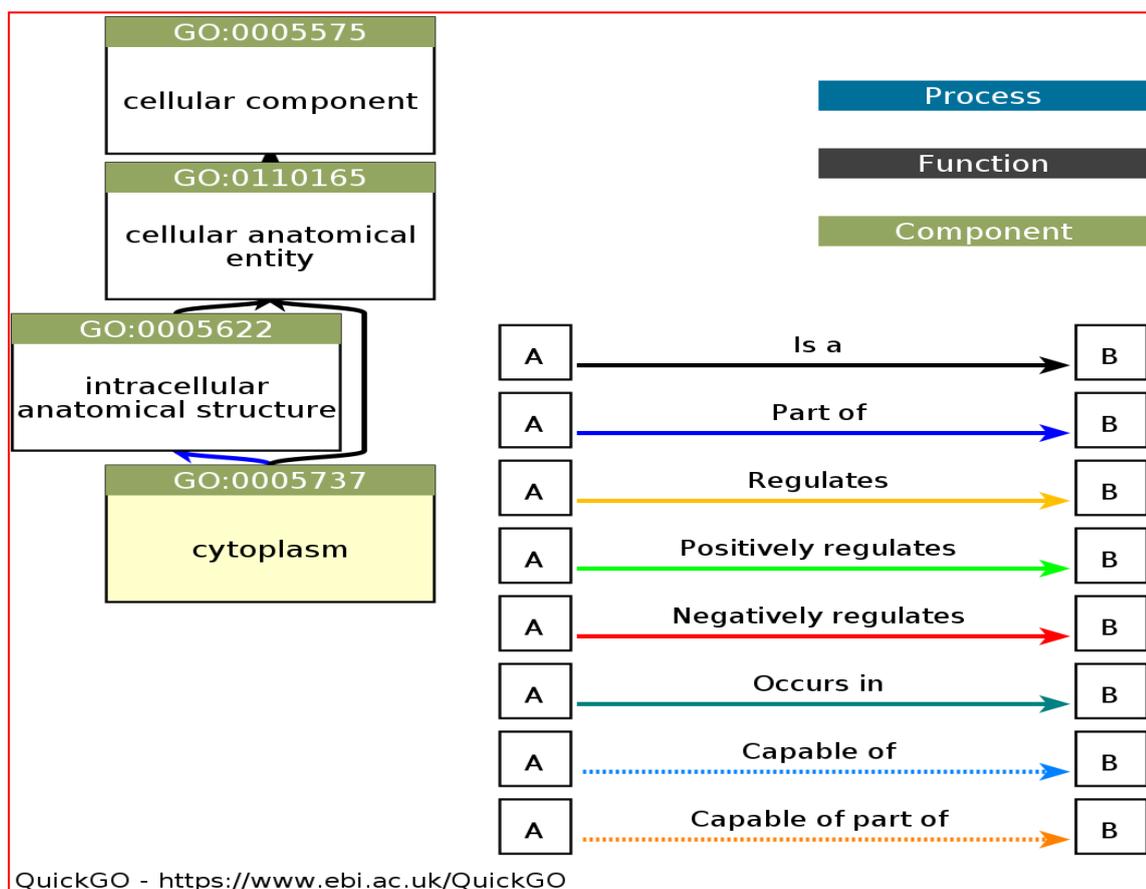


Figure 28. Mode d'action de la protéine sérine/thréonine protéine kinase dans cytoplasme (NCBI,2024)

***Conclusion
générale***

Conclusion et perspectives :

L'olivier, essentiel sur les plans nutritionnel et économique, nécessite une surveillance accrue pour détecter les bioagresseurs. Cette étude a permis d'isoler *Verticillium dahliae*, responsable du flétrissement verticillien, à partir de tiges et rameaux présentant des symptômes typiques. L'identification se fait sur milieu PDA, mais l'isolement peut échouer en raison de la complexité de la culture de l'agent et des contraintes des laboratoires.

En revanche, nous avons réalisé des analyses bioinformatiques pour étudier les mécanismes d'action de la protéine sérine/thréonine kinase, impliquée dans la pathogénicité de *V. dahliae*. Cette approche vise à développer de nouvelles stratégies pour lutter contre le flétrissement verticillien, notamment en utilisant le docking moléculaire pour identifier des molécules capables d'inhiber l'action de cette protéine.

La protéine sérine/thréonine kinase, localisée principalement dans le cytoplasme et parfois dans le noyau des cellules fongiques, joue un rôle crucial dans la transduction du signal et la régulation de processus cellulaires tels que la croissance, la différenciation et la virulence du champignon.

Le gène VDAG-05856, qui code pour cette protéine chez *V. dahliae*, a été identifié comme un facteur de virulence majeur. Des recherches récentes ont démontré que la suppression de ce gène diminue considérablement la capacité du champignon à infecter ses hôtes végétaux.

Perspectives :

Encourager d'autres études sur cette pathologie de l'olivier en Algérie, avec un monitoring des vergers oléicoles et des parcs à bois. Cela permettrait d'assurer l'assainissement sanitaire du matériel végétal de propagation, s'inscrivant ainsi dans le développement durable du secteur agricole et la sécurité alimentaire.

Réaliser des isolements supplémentaires à partir du sol et des plants d'olivier, en utilisant des techniques moléculaires avancées telles que la PCR quantitative ou le séquençage de nouvelle génération pour la détermination et la caractérisation précise de *Verticillium dahliae*.

Rechercher des méthodes de lutte efficaces contre cette maladie en Algérie, en explorant des approches innovantes comme l'utilisation d'agents de biocontrôle ou le développement de cultivars résistants.

Sélectionner des souches antagonistes pour lutter biologiquement contre ces agents pathogènes, en se concentrant sur des microorganismes bénéfiques tels que *Trichoderma* spp. Ou certaines bactéries promotrices de la croissance des plantes.

Approfondir l'étude de la protéine sérine/thréonine kinase et du gène VDAG-05856 par des approches expérimentales, notamment par des techniques de microscopie confocale pour localiser précisément la protéine, et par des expériences de mutagenèse dirigée pour identifier les domaines fonctionnels cruciaux pour la pathogénicité.

Développer des inhibiteurs spécifiques de la protéine sérine/thréonine kinase basés sur les résultats du docking moléculaire, et tester leur efficacité *in vitro* et *in planta*.

Étudier les interactions entre *V. dahliae* et le microbiome de l'olivier pour identifier d'éventuels antagonistes naturels ou des facteurs favorisant la résistance de la plante.

Références
bibliographique

Références bibliographiques

1. Acharya, B., Ingram, T.W., Oh, Y., Adhikari, T.B., Dean, R.A. & Louws, F.J. 2020. Opportunities and challenges in studies of host-pathogen interactions and management of *Verticillium dahliae* in tomatoes. *Plants*, 9: 1622. <https://doi.org/10.3390/plants9111622>
2. Al-Ahmad, M.A. & Mosli, M.N. 1993. *Verticillium* wilt of olive in Syria. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 23: 521- 529. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1993.tb01364.x>
3. Amouretti, M. C. et Comet, G. 200. *Le livre de l'olivier*. 2^{ème} édition. 90p
4. Barazani, O., Dag, A. & Dunseth, Z. 2023. The history of olivecultivation in the southern Levant. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1131557. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1131557>
5. Barnett, H.L. & Hunter, B.B. 1978. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Saint Paul, Minnesota : Burgess Publishing Company.
6. Bartolini, G., Pervost, G., Messeri, C. & Gargnari, G., 1998. *Olive germplasm; cultivars and world-wide collections*. F.A.O Roma.
7. Bejarano-Alcázar, J., Melero-Vara, J., Blanco-López, M. & Jiménez-Díaz, R. 1995. Influence of inoculum density of defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* on epidemics of *Verticillium* wilt of cotton in southern Spain. *Phytopathology*, 85: 1474- 1481. <https://doi.org/10.1094/Phyto-85-1474>
8. Bellahcene, 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: 41-43. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20016786897>
9. Benderradji, L., Bouzerzour, H., Ykhlef, N., Djekoun, A. & Kellou K., 2007. Réponse à la culture in vitro de trois variétés de l'olivier (*Olea europaea* L.). *Sciences et Technologie C-N°26*, Décembre 2007, pp.27-32.
10. Blanco-López, M.A., Jiménez-Díaz, R.M. & Caballero, J.M. 1984. Symptomatology, incidence and distribution of *Verticillium* wilt of olive trees in Andalucía. *Phytopathologia Mediterranea*, 23: 1-8.

11. Breton, C., Tersac, M. & Berville´ A., 2006. Genetic diversity and gene flow between the wild olive (oleaster, *Olea europaea* L.) and the olive: several Plio-Pleistocene refuge zones in the Mediterranean basin suggested by simple sequence repeats analysis. *J Biogeogr* 33:1916–1928.
12. Calderón, R., Navas-Cortés, J.A. & Zarco-Tejada, P.J. 2015. Early detection and quantification of *Verticillium* wilt in olive using hyperspectral and thermal imagery over large areas. *Remote Sensing*, 7: 5584-5610. <https://doi.org/10.3390/rs70505584>
13. Cardoni, M., Quero, J.L., Villar, R. & Mercado-Blanco, J. 2022. Physiological and structural responses of olive leaves related to tolerance/susceptibility to *Verticillium*
14. Chen, J.Y., Xiao, H.L., Gui, Y.J., Zhang, D.D., Li, L., Bao, Y.M. & Dai, X.F. 2016. Characterization of the *Verticillium dahliae* exoproteome involves in pathogenicity from cotton-containing medium. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1709. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01709>
15. Chen, Y., Zhai, S., Sun, Y., Li, M., Dong, Y., Wang, X., ... & Zhang, Z. (2015). MoTup1 is required for growth, conidiogenesis and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular plant pathology*, 16(8), 799-810.
16. Ding, S.; Zhou, X.; Zhao, X.; Xu, J.-R.(2009). The PMK1 MAP Kinase Pathway and Infection- Related Morphogenesis. In *Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease*; Metzler, J.B., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 13- 21.
17. FAOSTAT, 2020. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Agricultural Statistics. Available at, <http://www.faostat.fao.org/>.
18. Inderbitzin, P., Bostock, R. M., Davis, R. M., Usami, T., Platt, H. W., & Subbarao, K. V. (2011). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLoS one*, 6(12), e28341.
19. Jelen, V., De Jonge, R., Van de Peer, Y., Javornik, B., & Jakše, J. (2016). Complete mitochondrial genome of the *Verticillium*-wilt causing plant pathogen *Verticillium nonalfalfae*. *PLoS One*, 11(2), e0148525.
20. Jeseničnik, T., Kaurin, A., Grgič, Z., Radišek, S., Jakše, J. & Štajner, N. 2023. Novel identification of the collection of pathogenic fungal species

- Verticillium with the development of species-specific SSR markers. *Pathogens*, 12: 535. <https://doi.org/10.3390/pathogens12040535>
21. Klosterman, S. J., Subbarao, K. V., Kang, S., Veronese, P., Gold, S. E., Thomma, B. P.,... & Ma, L. J. (2011). Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens. *PLoS pathogens*, 7(7), e1002137
22. Landa, B.B., Pérez, A.G, Luaces, P., Montes-Borrego, M., Navas-Cortés, J.A & Sanz, C. 2019. Insights into the effect of *Verticillium dahliae* defoliating-pathotype infection on the content of phenolic and volatile compounds related to the sensory properties of virgin olive oil. *Frontiers in Plant Science*, 10: 232. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00232>
23. Loussert, R. & Brousse, G., 1978. L'olivier. Systématique et classification botanique. G.P. Maisonneuve et Larose, Paris
24. Mamalis, M., Kalampokis, E., Kalfas, I. & Tarabanis K. 2023. Deep learning for detecting *Verticillium* fungus in olive trees: Using YOLO in UAV imagery. *Algorithms*, 16: 343. <https://doi.org/10.3390/a16070343>
25. Markakis, E.A., Krasagakis, N., Manolikaki, I., Papadaki, A.A., Kostelenos, G. & Koubouris, G. 2022. Evaluation of olive varieties resistance for sustainable management of *Verticillium* wilt. *Sustainability*, 14: 9342. <https://doi.org/10.3390/su14159342>
26. Marton, K., Flajšman, M., Radišek, S., Košmelj, K., Jakše, J., Javornik, B., & Berne, S. (2018). Comprehensive analysis of *Verticillium nonalfalfae* in silico secretome uncovers putative effector proteins expressed during hop invasion. *PLoS One*, 13(6), e0198971
27. Nantel, A.; Dignard, D.; Bachewich, C.; Harcus, D.; Marcil, A.; Bouin, A.-P.; Sensen, C.W.; Hogues, H.; Hoog, M.V.H.; Gordon, P.; et al.(2002). Transcription Profiling of *Candida albicans* Cells Undergoing the Yeast-to-Hyphal Transition. *Mol. Biol* , 13, 3452-3465.
28. Park, G.; Xue, C.; Zhao, X.; Kim, Y.; Orbach, M.; Xu, J.-R.(2006). Multiple Upstream Signals Converge on the Adaptor Protein Mst50 in *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* , 18, 2822-2835.

29. Rapilly, F. 1991. L'Épidémiologie en Pathologie végétale. Mycoses aériennes. INRA Editions, Paris.
30. Rhouma, A., Hajji-Hedfi, L., Kouadri, M. E. A., Atallaoui, K., Okon, G.O. & Khriea, M. I.. 2023. Verticillium wilt of olive and its control caused by the hemibiotrophic soilborne fungus *Verticillium dahlia*. *Microbial Biosystems* 8(2) (2023) 2024.255400 DOI: 10.21608/MB.2024.255400.1089
31. Rugini, E., Pezza, A., Muganu, M. & Caricato G., 2000. Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). In: Bajaj, Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I*, Vol. 30. Springer Verlag, Berlin, pp. 404–414.
32. Santos-Rufo, A., Pérez-Rodríguez, M, Heis Serrano, J., Roca Castillo, L.F. & López-Escudero, F.J. 2022. Effect of previous crops and soil physicochemical properties on the population of *Verticillium dahliae* in the Iberian Peninsula. *Journal of Fungi*, 8: 988.

Références web

1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=verticillium+dahaliae++vdl.17>
Consulté le **25/05/2024**.
2. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A444RZ68/entry> Consulté le
01/06/2024
3. <https://swissmodel.expasy.org/interactive> Consulté le **06/06/2024**