

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

ADDAR HOCINE ET AZZEDINE NOUR EL HOUDA

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN AGRONOMIE

Spécialité : PROTECTION DES CULTURES

THÈME

Etude de l'influence de quelques facteurs sur le comportement « *in vitro* » de *Verticillium sp*, agent de la Verticilliose de l'olivier. Et évaluation de l'effet antifongique de l'extrait méthanoïque de *Salvia officinalis* à son égard.

Soutenue publiquement le 12/06/2016

DEVANT LE JURY

Président	M ^{ELLE} .BOUALEM. M	MCB U. Mostaganem
Encadreur	M ^M .SAIAH. F	MCB U. MOSTAGANEM
Co-encadreur	M ^M .BENOURAD. F	MCB U. Mostaganem
Examineurs	M ^M .BERGUEL. S	MAA U.Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire de protection des végétaux et l'atelier agricole.

Liste des figures

Figure 01 : Dissémination de l'olivier cultivé de l'Est à l'Ouest de la Méditerranée	4
Figure 02 : photo d'un olivier.....	6
Figure 03 : Air de repartition de la culture de l'olivier dans le monde	6
Figure 04 : Répartition de l'oléiculture en Algérie par régions.....	8
Figure 05 : Cycle de développement de la <i>V. dahliae</i>	16
Figure 06 : exemple de quelques acides phénols.....	21
Figure 07 : différente classe de flavonoïde.....	22
Figure 08 : Aspect générale de la sauge.....	23
Figure 09 : Echantillon de la Sauge.....	30
Figure 10 : dilution du composé phénolique.....	31
Figure 11 : Aspect macroscopique de <i>Verticillium</i> sp.....	38
Figure 12 : Aspect microscopique de <i>Verticillium</i> sp1.....	39
Figure 13 : Influences des différents milieux de culture sur la croissance mycélienne de l'isolat de <i>Verticillium</i> sp.1.....	39
Figure 14 : Influences des différents milieux de culture sur la croissance mycélienne de l'isolat <i>Verticillium</i> sp.2.....	40
Figure 15 : Influence des différents milieux de culture sur la croissance mycélienne de l'isolat <i>Verticillium</i> sp.1.....	40
Figure 16 : Influence des différents milieux de culture sur la croissance mycélienne de l'isolat <i>Verticillium</i> sp.2.....	41
Figure 17 : la vitesse de croissance des deux isolats de <i>Verticillium</i> sp. cultivés sur différents milieux.....	41
Figure 18 : Influence des températures sur la croissance mycélienne (cm/j) de <i>Verticillium</i> sp.1.....	43

Figure 19 : Influence des températures sur la croissance mycélienne (cm/j) de <i>Verticillium</i> sp.2.....	43
Figure 20 : la vitesse de croissance des deux isolats de <i>Verticillium</i> sp. incubés à différentes températures.....	44
Figure 21 : Influence de la température sur la croissance mycélienne de l'isolat de <i>Verticillium</i> sp.1.....	45
Figure 22 : Influence de la température sur la croissance mycélienne de l'isolat de <i>Verticillium</i> sp.2.....	45
Figure 23 : Influence de l'humidité relative sur la croissance mycélienne de l'isolat <i>Verticillium</i> sp.1.....	46
Figure 24 : Influence de l'humidité relative sur la croissance mycélienne de l'isolat <i>Verticillium</i> sp.2.....	47
Figure 25 : Influence de l'humidité sur la vitesse de croissance (cm/j) des deux isolats de <i>Verticillium</i> sp:.....	47
Figure 26 : Influence de l'humidité relative sur la croissance mycélienne (cm/j) de l'isolat <i>Verticillium</i> sp.1.....	48
Figure 27 : Influence de l'humidité relative sur la croissance mycélienne (cm/j) de l'isolat <i>Verticillium</i> sp.2.....	48
Figure 28 : Influence du pH sur la croissance mycélienne de l'isolat <i>Verticillium</i> sp.1.....	49
Figure 29 : Influence du pH sur la croissance mycélienne de l'isolat <i>Verticillium</i> sp.2.....	49
Figure 30 : Influence du pH sur la croissance mycélienne (cm/j) de l'isolat <i>Verticillium</i> sp.....	50
Figure 31 : Influence du pH sur la croissance mycélienne (cm/j) de l'isolat <i>Verticillium</i> sp.1.....	50
Figure 32 : influence de pH sur la croissance mycélienne (cm/j) de l'isolat <i>Verticillium</i> sp.2.....	51
Figure 33 : Effet de l'extrait de la sauge sur la croissance mycélienne de <i>Verticillium</i> sp.1.....	53

Figure 34 : Effet de l'extrait de la sauge sur la croissance mycélienne de <i>Verticillium sp.2</i>	54
Figure 35 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Verticillium sp.1</i> et <i>Verticillium sp.2</i> sous l'effet des différentes concentrations de l'extrait polyphénolique de <i>Salvia officinalis</i>	55
Figure 36 : Effet de l'extrait polyphénolique de <i>Salvia officinalis</i> sur la croissance mycélienne de <i>sp.2</i>	55
Figure 37 : Effet de l'extrait polyphénolique de <i>Salvia officinalis</i> sur la croissance mycélienne de <i>sp.1</i>	56
Figure 38 : Taux d'inhibition de la sporulation de <i>Verticillium sp.1</i> et <i>Verticillium sp.2</i> sous l'effet des différentes concentrations de l'extrait polyphénolique de <i>Salvia officinalis</i>	56
Figure 38 : Taux d'inhibition de la sporulation de <i>Verticillium sp.1</i> et <i>Verticillium sp.2</i> sous l'effet des différentes concentrations de l'extrait polyphénolique de <i>Salvia officinalis</i>	57
Figure 40 : Degré d'attaque des deux isolats sur des plantules de tomate variété Ouzna traités à l'extrait de sauge.....	57

Liste des planches

Planche 01: Dispositifs d'extraction.....31

Planche 02 : les différents étapes de trempage racinaire et inoculation des agents phytopathogènes.35

Liste des tableaux

Tableau 01 : Superficies des principaux pays producteurs d'olives dans le monde.....	7
Tableau 02 : Répartition Régionale du Potentiel oléicole.....	8
Tableau 03 : les principales maladies d'origines abiotiques.....	10
Tableau 04 : les principales maladies fongiques et bactériennes de l'olivier.....	11
Tableau 05 : les principaux ravageurs de l'olivier.....	12
Tableau 06 : les composés phénolique de la sauge.....	24
Tableau 07 : Quantité de produit à utiliser.....	28
Tableau 08 : Quantité d'Hcl et de NaOH nécessaire pour obtenir la gamme de pH allant de 4,1 à 8,1.....	29
Tableau 09 : Influence des différents milieux de culture sur la sporulation (spores. 106 /ml) des deux isolats de <i>Verticillium</i> sp.(spores / ml.106).	42
Tableau 10 : Influence des températures sur la sporulation des deux isolats de <i>Verticillium</i> sp. (x 106spores / ml.).	45
Tableau 11 : Influence de l'humidité sur la sporulation (spores/ml.106) des deux isolats de <i>Verticillium</i> sp. (spores/ ml)	48
Tableau 12 : Influence du pH sur la sporulation (spores/ml.106) des deux isolats de <i>Verticillium</i> sp.	51
Tableau 13 : Degré d'attaque des deux isolats sur des plantules de tomate traités à l'extrait de sauge.	58

Liste des abréviations

% : pourcentage

°C : Celsius

cm : centimètre

D : défoliant

g : gramme

Ha : hectare

INRA : Institut National De La Recherche Agronomique

J-C: Jésus-Christ

KLEB: Klebahn

L : Linné

ml : millilitre

mm : millimètre

ND : non défoliant

P.D.A : potato dextrose agar

V.dahliae : *verticillium dahliae*

Introduction

Les plantes subissent les attaques de nombreux bio-agresseurs. Parmi eux, les champignons pathogènes causent des maladies sur tous les organes des plantes (**LEPOIVRE et al., 2003**).

L'olivier (*Olea europaea* L) est une espèce sensible à l'attaque d'agents phytopathogènes tels que les *Verticillium* spp. Leur développement rapide et insidieux, engendre chaque année la destruction de centaine d'arbre d'olivier. Cet agent tellurique occasionne des dégâts avec des conséquences très importantes sur le rendement et la qualité de récolte. Pour diminuer les pertes de rendement occasionnées sur l'olivier, la méthode de lutte chimique reste la solution la plus efficace. Cependant, les inconvénients liés à l'utilisation répétée des produits de synthèse entraîne souvent la pollution de l'environnement avec une apparition de souches résistantes et augmente la quantité des résidus sur les fruits (**OZBAY et NEWMAN, 2004**).

C'est pourquoi les scientifiques sont à la recherche d'alternatives moins dangereuses. Ils se sont alors orientés vers la lutte biologique par l'utilisation de substances naturelles antifongiques plus sécuritaires pour les humains et pour l'environnement. Parmi ces substances naturelles figure les extraits polyphénoliques des plantes aromatiques.

Les plantes aromatiques constituent une richesse naturelle très importante, dont la valorisation demande une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur. Les propriétés des plantes dépendent de la présence d'agents bioactifs variés et appartenant à différentes classes chimiques (**MAILHEBIAU, 1994**).

L'Algérie, par sa situation géographique, offre un grand nombre de plantes aromatiques qui y pousse spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. C'est dans cette optique, qu'on s'est intéressé à une espèce qui appartient à la famille des Lamiacées ; *Salvia officinalis*, est un arbuste indigène très prisé en phytothérapie.

Notre travail a pour l'objectif d'étudier le comportement *in vitro* de *Verticillium* sp et de mettre en évidence une éventuelle activité antifongique « *in vitro* » et « *in vivo* » de l'extrait polyphénolique de *Salvia officinalis* vis-à-vis de ce même phytopathogène.

Il est réparti en deux parties :

- La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique mettant l'accent sur trois chapitres ; le premier chapitre traite des généralités sur la plante hôte olivier (*Olea europaea*), le second présente le champignon phytopathogène, est le troisième chapitre est consacré à *Salvia officinalis*.

➤ La deuxième partie réservée à l'étude expérimentale est subdivisée en deux chapitres ; L'un présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail alors que l'autre est consacré à la présentation et la discussion des résultats obtenus.

I. Généralité sur l'olivier

I-1. Origine et extension de l'olivier

L'oléastre et l'olivier sont les deux variétés botaniques de l'*Olea europea* L. La première est sauvage, la seconde est cultivée. L'olivier appartient à la famille des *Oleaceae* comme le lilas, le troène, le jasmin et le frêne. Ils appartiennent à la sous-espèce *europaea* de l'espèce *Olea europaea*. (BRETON *et al.*, 2006). Son origine remonte à 50. 000-60. 000 ans (VELITZELOS *et al.*, 2005) en Syrie, en Asie Mineure, au Proche-Orient (FOUIN et SARFATI, 2002). Cependant, Gaussorgues (2009) rapporte que sa provenance tient de l'Afrique du côté de l'Egypte ou de l'Ethiopie. La domestication de l'olivier semble être bien tardive, 6000 ans BP (TERRAL *et al.*, 2004 ; CABALLERO et DEL RIO, 2008 ; DI RITA et MAGRI, 2009) au Levant à l'Est méditerranéen (ZOHARY et HOPF, 2000 ; LUMARET *et al.*, 2004) (fig. 1). Par la suite, l'olivier a été étendu vers l'Occident par les deux bords de la Méditerranée au gré des principales civilisations telles que les phéniciens, les Grecs puis les Carthaginois, les Romains et les Arabes (CIVANTOS, 2008 ; CARRION *et al.*, 2010). Ce n'est qu'au 19^{ème} siècle, que la culture de l'olivier s'implante durablement sur tout le pourtour de la Méditerranée (AMOURETTI, 2000).

Plus tard, la culture de l'olivier fait un bon en dehors du Bassin méditerranéen (GARCIA- VERDUGO *et al.*, 2010) pour s'introduire au nouveau monde (Pérou, Chili, Mexique, Argentine, Brésil et Etat unis (Californie)) (CIVANTOS, 2008), à l'Inde, au Caucase et au Sud de l'Asie (Chine, Malaisie et Maui), elle s'est conduite également en Afrique du Sud, en Australie, en Japon, en chine et plus récemment en Nouvelle – Calédonie (RHIZOULOPOULOU, 2007 ; LEROY, 2011).



Figure 01 : Dissémination de l'olivier cultivé de l'Est à l'Ouest de la Méditerranée (LEMEE et RAMADE, 2008)

I-2. Etymologies et nomenclature

L'olivier fut appelé *Alea*, pour la première fois par les grecs au 13^{ème} siècle avant J-C, (CHAWICK, 1958 ; SIMANDIRAKIS et LYKOUDI, 2002), pour être nommé *elaa* et *elam* (HOAD, 1991), que deviendra *oleum* et *olea* en latin, *olay* en hongrois, *oliifbroom* en flamand et en hollandais, *oliven* en allemand, *oliva* en espagnol et en portugais, *olivo* en italien, olive en anglais et *olivier* en français (GIGON et LE JEUNE, 2010), *ezaïth* en hébreu est passé sous l'appellation *zeytin* en turque (PAGNOL, 1975 ; WAGNER *et al.*, 1999), *zaytunn* en arabe pour l'olivier cultivé et *zenboudje* pour l'olivier sauvage (SIMANDIRAKIS et LYKOUDI, 2002).

Scientifiquement, l'olivier appelé *Olea europea* Linné (LINNE, 1764). L'épithète générique *Olea* désigne l'arbre de l'olivier, tandis que le nom spécifique *europea* indique son terroir européen typique de la zone méditerranéenne (PERCY et NEWBERRY, 1937). D'ailleurs *Olea europea* Linné est l'unique espèce méditerranéenne représentative du genre *Olea* (HENRY, 2003).

I-3. Identité taxonomique et origine génétique

L'olivier (*Olea europea* L.), espèce caractéristique du paysage méditerranéen appartient à la famille des *Oléacées*, caractérisée par des fleurs hermaphrodites régulières, à pétales soudées, à deux étamines, à deux ovules par loge. Ce sont des plantes ligneuses à feuilles opposées et à fruits charnus (FAHAULT, 1886 ; MORETTINI, 1972). Le genre *Olea* regroupe 35 espèces (CORDEIRO *et al.*, 2008). La seule espèce portant des fruits comestibles est l'*Olea europea* L. (BRETON *et al.*, 2006 ; RUBIO de CASAS *et al.*, 2006). Selon la

systématique moléculaire de Strikis *et al.*, (2010), la classification de l'olivier (*Olea europea* L.) est la suivante :

Règne.....	Plante
Sous Règne	Tracheobionate
Division.....	Magnoliphytes
Embranchement.....	Spermaphytes
Sous Embranchement.....	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous Classe.....	Astéridées
Ordre	Lamiales
Famille.....	Oléacées
Genre	<i>Olea</i>
Espèce	<i>Olea europea</i>

Olea europea est un complexe de 6 sous-espèces supposées inter-fertiles (**BRETON *et al.*, 2006 ; RABIO de CASAS *et al.*, 2006**) dont l'une comporte 2 variétés : *subsp. europea* (Var. *europea*, l'olivier cultivé et var. *sylvestris* (Mill.) Lehr., l'oléastre ou olivier sauvage), *subsp. cerasiformis*, *subsp. cuspidata*, *subsp. guanchica*, *subsp. laperrini*, *subsp. maroccana*.

Ce complexe se différencie par ses caractères phénotypiques, génotypiques et sa répartition géographique (**GREEN, 2002 ; TERRAL *et al.*, 2004**).

Il est présent depuis l'Afrique du sud jusqu'en Chine, en Méditerranée, en Macaronésie et dans les montagnes sahariennes, en Australie et dans plusieurs archipels de l'Océan Pacifique (**GREEN, 2002**).

Les études de la diversité moléculaire de l'olivier montre que l'oléastre semble être l'ancêtre de l'olivier cultivé (**BRETON *et al.*, 2006a et b ; CABALLERO et DEL RIO, 2008 ; BESNARD *et al.*, 2009 ; BELAJ, 2010**), la combinaison d'oléastre localement sélectionnés et de cultivars importés (**BESNARD *et al.*, 2001 ; KHADARI, 2005**), donne actuellement plus de 2500 cultivars recensés à travers le monde (**CORDEIRO *et al.*, 2008 ; OZGENTURK *et al.*, 2010**).

L'ensemble des cultivars sont diploïdes ($2n = 2x = 46$), principalement allogames dont la taille génome est environ 1.800 MB (**LOUREIRO *et al.*, 2007 ; BESNARD *et al.*, 2008**).



Figure 02 : photo d'un Olivier (Original, 2016).

I-4. Répartition de la culture de l'olivier dans le monde

Bien que l'olivier soit présent dans les quatre continents, environ 98% de la production mondiale de l'huile d'olive provient du Bassin méditerranéen. L'olivier est considéré comme une espèce caractéristique de la région méditerranéenne. On le rencontre surtout entre le 25^{ème} et 45^{ème} degré de latitude, dans l'hémisphère nord aussi bien que sud. Les implantations de l'olivieraie en Europe méditerranéenne sont limitées au nord au 45^{ème} degré de latitude, limite imposée par les Froids hivernaux et les fréquentes gelées printanières.

Dans la rive sud de la méditerranée en Afrique du nord, l'olivier n'est pratiquement plus cultivé au-delà du 25^{ème} degré de latitude, limite imposée par les rigueurs du climat présaharien vers le sud.

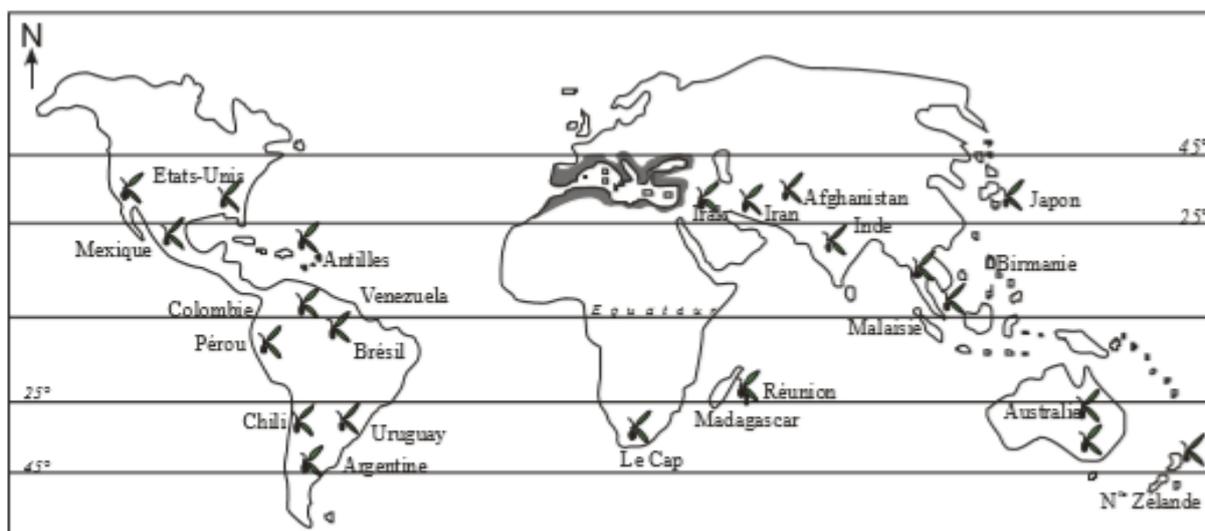


Figure 03 : Aire de répartition de la culture de l'olivier dans le monde.

La surface oléicole mondiale est estimée à environ 8.600.000 ha pour une production d'environ 17.3 millions de tonne d'olive, sur laquelle sont plantés plus de 800 millions d'oliviers. Elle est principalement située dans le bassin méditerranéen (95%). 85% de cette surface se trouvent dans les zones semi-aride. Cette filière concerne plus de 7 millions de familles, soit 30 millions de personnes, et s'évalue à 7 milliards de dollars (NASLES, 2006).75% des terres cultivées sont réparties en petites superficies. La qualité mondialement reconnue de l'huile d'olive pour la santé humaine a entraîné une extension des zones de culture de l'olivier (QATIBI *et al.*, 2004).

Les quatre premiers pays producteurs (Espagne, Tunisie, Italie et Grèce) représentent 80% de la production mondiale d'olive et les dix premiers sont tous situés dans la zone méditerranéenne (Tableau 01).

Tableau 01 : Superficies des principaux pays producteurs d'olives dans le monde (ARGENSON, 2008).

Année 2006	Superficie (ha)	Olivier cultivés (ha)	2010-2012(ha)	Plantation annuelles (ha)
Espagne	2476000	2300000	2500000	4000
Tunisie	1698000	1460000	1722000	4000
Italie	1378000	1278000	1390000	2000
Grèce	1157000	1017000	1165000	1333
Turquie	815000	660000	855000	37500
Maroc	625000	540000	850000	4000
Syrie	547000	385000	571000	4000
Portugal	369000	335000	375000	1000
Algérie	245500	190500	315000	11583
Egypte	60000	45000	65500	917

I -5. Répartition de l'oléiculture en Algérie

I -5-1. Répartition Régionale du Potentiel oléicole

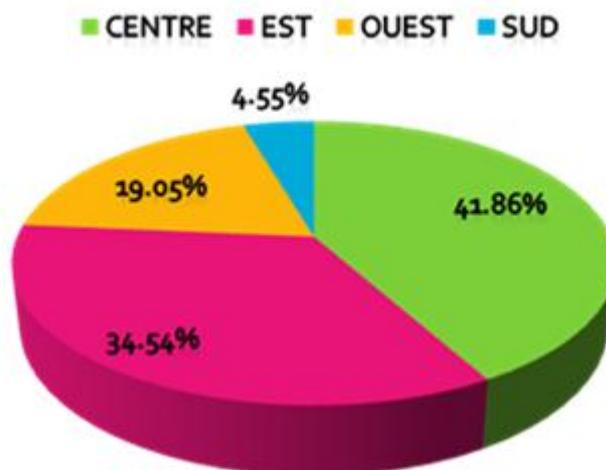
L'oléiculture en Algérie s'étend sur une superficie de 383 443 ha, avec un nombre de 50 369 990 d'oliviers dont 44 664 333 en masse et 5 705 657 en isolés. Le nombre d'oliviers en production est de 30 527 175 arbres soit 61 % du nombre total d'oliviers (D.S.A.S.I, 2014).

Tableau 02 : Répartition régionale du potentiel oléicole.

Régions	Superficie occupée (ha)	Nombre d'arbre d'oliviers			
		en masse	isolés	Total complanté	en rapport
Centre	160 515	15 733 710	1 734 624	17 468 334	12 505 153
Est	132 439	15 532 261	1 929 070	17 461 331	9 205 380
Ouest	73 032	9 734 916	1 492 636	11 227 552	7 230 848
Sud	17 457	3 663 446	549 327	4 212 773	1 585 794
Total	383 443	44 664 333	5 705 657	50 369 990	30 527 175

Le verger oléicole national représente 4.54 % de la surface agricole utile (8 465 040 ha). L'oléiculture est concentrée dans la région Centre avec 160 515 ha suivie de la région Est avec 132 439 ha, la région Ouest avec 73 032 ha soit 41.86%, 34.54%, 19.05% respectivement de la superficie complantée en olivier.

Le Sud est la partie prenante du développement de l'oléiculture qui a un impact sur le développement de l'oléiculture au niveau national, il occupe un taux de 4.55% avec 17 457ha.

**Figure 04** : Répartition de l'oléiculture en Algérie par régions (D.S.A.S.I, 2014)

1-6-1-Variétés d'olivier cultivées en Algérie

L'Algérie grâce à sa situation géographique et à sa diversité pédoclimatique dispose d'un assortiment assez riche de variétés marquant chacune les traits édaphiques et climatique qui caractérisent sa zone d'implantation (**DOUZANE *et al.*, 2010**). Plus de 150 variétés d'olives autochtones ont été dénombrées par Chaux (**1995**), et 173 variétés entre autochtones et introduites ont été collectionnées par l'INRA. De ce nombre, 48 variétés sont autorisées, dont 11 font actuellement la réputation de l'oléiculture algérienne (**CHAOUIA *et al.*, 2003**; **DOUZANE *et al.*, 2010**). Les variétés « Chemlal » et « Sigouse », constituent le profil variétal dominant, tandis que les variétés « Azeradj », « Limli », « Bouchouk », « Hamma », « verdale », « Comicabra », « Rougette », « Blanquette » et « Gordal » représente le reste du patrimoine variétal (**SAHLI, 2009**).

Les deux principales variétés multipliées en Algérie, sont chemlal destinée pour la production d'huile (44%) et la sigoise pour l'olive de table (54%).

- ✓ Chemlal : c'est une variété plus dominante en Kabylie, elle s'étend de l'atlas et de la Mitidja jusqu'au Bibans et le Guergour. Arbre vigoureux et productif qui produit une meilleure huile de qualité (14%). C'est l'une des plus estimées pour la fabrication de l'huile avec un fruit en moyen de 2.5 grammes.
- ✓ Azeradj et Bouchouk : elles accompagnent généralement les peuplements de chemlal dont Azeradj améliore la pollinisation, ces variétés ont deux fins, polinisation et production d'huile (15 à 20% d'huile).
- ✓ Rougette et Blanquette de Guelma : ces deux variétés à huile se trouvent en mélange dans les régions de l'Est du pays, (15% d'huile).
- ✓ Sigoise : cette variété est la plus répandue dans la région oranaise, elle est plus appréciée pour sa qualité d'olive de table, elle est localisée au niveau des plaines de l'Ouest, et plus exactement dans la plaine de Sig dont elle porte le nom Sigoise. C'est une variété à deux fins, qui constitue la majeure partie de nos olives de table conservés pour la consommation locale et l'exportation. Elle dérive de la variété picholine française.
- ✓ Sevillane ou Gordal : Originaire de l'Espagne, cette variété produit de gros fruits. Elle est localisée dans la plaine sublittorale oranaise, est utilisée uniquement pour la production d'olive de tables vertes.

De nombreuses études ont été faites par **BEDDIAR *et al.*, (2008)** ; **SAAD *et al.* (2009)** ; **BEN SID et CHAOUCH KOUANE (2010)**, **MEDDAD-HAMZA *et al.*, (2010)** et **MEDDAD-HAMZA *et al.*, (2011)** pour identifier et caractériser le patrimoine génétique des cultivars d'olivier existant en vue d'en améliorer et mettre au point une éventuelle variété résistante aussi bien à la grande diversité agro-écologique de nos zones de production qu'aux maladies abiotiques et biotiques qui menacent le verger algérien.

I- 7. Les principales maladies de l'olivier

I-7-1.Les maladies d'origine abiotiques

Il existe plusieurs maladies d'origine abiotiques chez l'olivier, qui sont résumé dans le tableau 03

Tableau 03 : les principales maladies d'origines abiotiques.

Type d'incidents	Facteurs favorisants	Manifestation des symptômes
Accidents climatiques	Le gel Brulures par insolation	Chute des feuilles, nécrose des jeunes écorces, infection parasitaire. Dégâts sur jeunes plantations, sur les tissus du tronc et sur les charpentières.
Accidents météorologiques	Neiges abondantes La grêle Les vents violents	Cassure des frondaisons sur récolte des fruits. Cassures et blessures des jeunes écorces, dissémination de la tuberculose. Cassure des charpentières, réduction de la récolte.
Asphyxie racinaire	Terrains trop humides et trop argileux.	Jaunissement (chlorose), défoliation, arrêt de la croissance végétative, chute précoce des fruits.
Chloroses alimentaires	Carences en éléments indispensable (azote, calcaire et ions Cl^- et Na^+)	Troubles physiologiques graves du végétal.

I-7-2.Les maladies d'origines biotiques

L'olivier comme d'autres arbres fruitiers est souvent attaqué par une multitude de bio-agresseurs (**BELLAHCEN, 2004**). On en connaît dans le monde 110 espèces d'insectes, 100 espèces de nématodes, 90 espèces fongiques, 13 espèces d'arachnides, 13 virus, 5 espèces bactériennes, 4 mousses, 3 lichens et 3 angiospermes (**FAUSTINO de ANDRES, 1965** ; **SASANELLI, 2009**).

Tableau 04 : les principales maladies fongiques et bactériennes de l'olivier.

Désignation de la maladie	Facteurs favorisants	Dégâts et conséquences	Méthodes de lutte	Références
Œil de paon (<i>cycloconium oleaginum</i> Cast.)	Température entre 10 et 25°C associée à des pluies. Présence de variétés sensibles.	Taches foliaires circulaires s'accroissant depuis le point de pénétration du champignon. Chute massive des feuilles. Affaiblissement des arbres. Perte de récolte.	Tailler l'olivier régulièrement. Maintenir une protection fongicide avant les pluies en automne et au printemps.	GUECHI et GIRRE, (2002).
Verticilliose (<i>Verticillium dahliae</i> Kleb.)	Jeunes vergers de moins de 10 ans avec un précédent cultural. Présence de certains adventices.	Dessèchement rougeâtre des rameaux. Sortie importante de rejets. Perte d'une charpentièrre ou de l'arbre.	Ne pas planter sur un terrain à risque. Ne pas travailler le sol et préférer un enherbement de graminées. Limiter la fertilisation et l'irrigation.	RENCHABANE, (1990), BELLAHCENE et al.,(2000) ; MATALLAHBOUTIBA, (1998) BELLAHCENE, (2004) ; BELLAHCENE et al., (2005a) (2005b).
Brunissement	Automne doux et humide. Variétés sensibles. Arbre vigoureux et très poussants, faiblement changés en fruits. Forte fumure azotée.	Pourrissement des olives et chute prématurée. Perte de récolte et mauvaise qualité d'huile.	Modérer la taille on taille bisannuelle. Fractionner les apports de phosphore au printemps, apporter le potassium à l'automne. Limiter la fertilisation en azote.	CIVANTOS, (1999).
Bactériose (<i>Pseudomonas savastanoi</i> Smith.)	Humidité et température supérieure à 18°C. variétés sensibles. Blessures diverses.	Tumeurs, nodules sur le bois. Eclatement de l'écorce. Baisse de vigueur et de production.	Désinfection du matériel de taille. Tailler les arbres atteints en dernier. Ne pas gratter le nodule. Pulvérisation cupriques après la taille ou un passage de grêle.	ASSAWAH et AYAT, (1985).

Tableau 05 : les principaux ravageurs de l'olivier.

Ravageurs	Biologie	Dégâts et conséquences	Méthodes de luttés	Références
Mouche de l'olive (<i>Dacus oleae</i> Gmel.)	Environ 1 génération par mois, de juillet à octobre, la femelle pond dans l'olive et l'asticot creuse une galerie dans la pulpe déclanchement du traitement par piégeage, traitement préventif ou curatif selon le pourcentage d'olive piquées observées.	Olive véreuses, perte de récolte et baisse de qualité.	Seuil d'intervention : 2 mouches capturées/piège/jour, appliquer à chaque vol un traitement localisé avec un attractif plus un insecticide autorisé, alterner les produits.	GEMEL et ROSSI (in LOUSSERT et BROUSSE, 1978). GAOUAR-BENYELLES, (1996).
Cochenille noire (<i>saissitia oleae</i> Bern.).	1 génération par an, se nourrit de la sève de l'arbre et produit un miellat poisseux, les jeunes larves sont mobiles et de couleur orangée	Développement de la fumagine, affaiblissement de l'olivier.	Seuil d'intervention : 1 cochenille vivante par rameau, appliquer un insecticide autorisé sur jeunes larves (juillet-aout), lâchers de métaphycusau printemps ou à l'automne, les coccinelles et les hyménoptères naturels sont très efficace pour diminuer la population.	BERNARD (in LOUSSERT et BROUSSE, 1978), GAOUAR-BENYELLES, (1996).
Teigne de l'olivier (<i>praysoleae</i> Bern.)	3 générations par an : printanière la chenille se nourrit des boutons floraux, estivale ou carpophage : la chenille pénètre dans le fruit et se nourrit de l'amandon du noyau, hivernale ou phyllophage : la chenille se développe dans les feuilles.	Chute des boutons floraux et des olives, perte de récolte.	Seuil d'intervention : 10% de feuilles minées en début de printemps, traitement avec <i>Bacillus thuringiensis</i> au stade gonflement des boutons floraux.	GAOUAR-BENYELLES, (1996).

II-La verticilliose de l'olivier

II-1. Définition et nomenclature

La verticilliose de l'olivier est une maladie cryptogamique dont l'agent étiologique est un champignon tellurique appelé *verticillium dahliae* **KLEB, (KLEBAHN, 1913)**. Cette maladie fongique a été signalée pour la première en Italie (**RUGGIERI, 1946**). Elle s'est ensuite répandue dans les pays oléicole les plus importants où elle a infligé des pertes considérables (**LOPEZ-ESCUDERO et MARCADO-BLANCO, 2010**).

La dénomination de la maladie verticilliose tient de l'agent causal *verticillium dahliae*, cette maladie est aussi appelée flétrissure verticillienne, trachéomyose et dépérissement de l'olivier. En Espagne, elle est connue sous le nom verticilosis delolivo, en Angleterre, verticillium wilt, en Italie tracheoverticilloso, en Russie Viltucikanie et en Arabe, Maradth dhouboul Azzaitoun (**TOMBESI et al., 2007**).

II-2. Classification

Le genre a été mis en évidence pour la première fois en 1816 par NEES VON ESENBECK. Basé sur la morphologie de ses conidiospores (**HEFFER, 1995**). L'espèce *dahliae* a été décrite pour la première fois par **KLEBAHN (1913)**. L'agent infectieux *V. dahliae* est imparfait, haploïde et dimorphes, (**PEGG et BRADY, 2002 ; KLOSTERMAN et al., 2009**), les données bibliographique (**FRADIN et THOMMA, 2006 ; Lopez-Escudero et MERCODO-BLANCO, 2010 ; MARTIN-LAPIERRE, 2011**) le classe comme suit :

Régne.....	Fungi
Phylum.....	Ascomycota
Sub-phylum.....	Pezizomycotina
Classe.....	Sordariomycètes
Sous classe.....	Incertaesedis
Ordre.....	Phyllachorales
Famille.....	Plectosphaerellacea
Genre.....	<i>Verticillium</i>
Espèce.....	<i>Verticillium dahliae</i> (Kleb)

Verticillium spp, vivent dans le sol. Ils sont présents dans les sols du monde entier, et sont importants à la fois comme saprophytes, et comme agents pathogènes sur plantes

cultivées. La plupart des espèces du genre *Verticillium* sont phytopathogènes et sont très polyphages et attaquent une grande diversité de culture (MESIAN et LAFON, 1970).

II-3. Facteurs influençant la maladie

L'humidité du sol et la température extérieure sont les deux facteurs les plus importants. L'incidence de la maladie est plus grande dans les oliveraies irriguées. En ce qui concerne la température, la sévérité de l'infection est favorisée au printemps par des températures de l'air durant la journée qui n'excèdent pas 22°C. Pendant l'été, les moyennes maximales diurnes ne doivent pas être supérieures à 30 – 35°C pour favoriser la maladie.

Dans des conditions expérimentales, avec une humidité optimale du sol, les conditions de développement maximal de la maladie se produisent à des températures comprises entre 21 et 27°C.

La plantation d'olivier sur les terres où ont été cultivées préalablement d'autres plantes sensibles telles que le cotonnier ou des cultures horticoles comme l'aubergine ou le piment favorise la maladie sur les oliviers et augmente l'acuité de l'infection, en raison de l'existence d'une grande quantité d'inoculum dans ces sols.

Les exsudats des bouts racinaires en germination de la plante hôte augmentent la germination des microsclérotés, donc l'augmentation de taux de l'inoculum dans le sol qui favorise l'infection de la plante (NAGTZAAM *et al.*, 1997).

II- 4. Les symptômes de la maladie

Les symptômes pathologiques externe de la verticilliose de l'olivier apparaissent traditionnellement sous une forme aiguë (dépérissement aigu) chez les jeunes arbres et une forme chronique (dépérissement lent) chez les vieux arbres (JIMENEZ-DIAZ *et al.*, 1998; BUBICI et CIRULLI, 2011).

Les symptômes du dépérissement aigu ou l'apoplexie se produit à la fin de l'hiver ou au début du printemps. Il se caractérise par une fanaison rapide et grave des rameaux, des branches secondaires et principales présentant une écorce de couleur brun-violacé progressant de l'extrémité vers la base. Ces organes foliacés portent des feuilles qui se recroquevillent vers leur face inférieure et perdent leur coloration verdâtre pour virer au brun clair, ce qui induit leur dessèchement complet. Cette forme de verticilliose est communément mortelle aux jeunes arbres d'oliviers (JIMENEZ-DIAZ *et al.*, 1998 ; CIVANTOS, 1999 ; TOMBESI *et al.*, 2007).

Les symptômes du dépérissement lent commence au printemps et progresse lentement jusqu'au début de l'été. Ils se caractérisent par une nécrose des inflorescences des oliviers infestés qui porte des fleurs sèches, momifiées ayant tendance à chuter. Les feuilles issues de bourgeons, se dessèchent et deviennent cassantes et chutent, tandis que les fruits se momifient et restent suspendus aux rameaux malades. Cette forme de verticilliose s'accompagne de sorties importantes de rejets au pied de l'arbre (CIVANTOS, 1999; BELLAHCENE, 2004; TOMBESI *et al.*, 2007).

Les symptômes pathologiques internes de la verticilliose de l'olivier se manifestent par un brunissement du xylème des branches infectées (VIGOUROUX, 1975 ; TOMBESI *et al.*, 2007) et du cylindre central du système racinaire (TRIKI *et al.*, 2006).

La sévérité des symptômes de cette maladie dépend principalement du type de sol, la densité d'inoculum, la virulence du pathogène, la susceptibilité du cultivar de l'olivier et les conditions environnementales (LOPEZ-ESCUADERO *et al.*, 2010 ; MARTIN-LAPIERRE, 2011).

II- 5. Cycle infectieux de l'agent pathogène

Verticillium dahliae peut survivre dans le sol durant plusieurs années, jusqu'à 20 ans, sous forme de microsclérotos (amas de cellules de 0.1 à 0.5 mm) libres ou dans des tissus infectés (CIVANTOS, 1999; JULIEN, 2005). Parasite facultatif, son cycle de développement se déroule en 2 phases, une phase saprophytique qui comprend une période d'activité et une phase parasitaire qui se déroule dans la plante-hôte (HIEMSTRA, 1998).

Pendant la phase saprophytique, le champignon pérennise sous sa forme de microsclérotos plus de 14 ans dans le sol aux dépens des débris végétaux et des matériaux organiques (WILHELM, 1955 ; TRIKI *et al.*, 2006). C'est ainsi qu'il se dissémine par le mouvement des sols infectés, les débris végétaux infectés, l'eau d'irrigation, l'équipement agricole, le vent, les insectes telluriques, prédateurs, pollinisateurs...etc. (CIVANTOS, 1999; KLOSTERMAN *et al.*, 2009 ; CHAWLA *et al.*, 2012). Il résiste aussi 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 des bonnes conditions de température et d'humidité du sol.

La phase parasitaire du champignon débute par la germination des microsclérotos en réponse aux exsudats racinaires de l'olivier. Il en résulte une émission des hyphes qui colonisent le cortex des racines. Le mycélium s'introduit par l'extrémité ou par les cellules épidermiques (GARBER, 1966) et gagne ensuite via la sève les vaisseaux du xylème, c'est l'infection primaire (FRADIN *et* THOMMA, 2006 ; VALLAD *et* SUBBARAO, 2008).

Le parasite se reproduit asexuellement dans les vaisseaux, à l'intérieur desquels il progresse, grâce aux transports des conidies par le flux de la sève ascendante aux pièces aériennes de l'arbre (VALLAD et SUBBARAO, 2008), où elles constituent des foyers secondaires d'infection ; c'est l'infection secondaire (GARBER, 1966).

La poursuite ainsi de l'infection du système vasculaire conjugué aux toxines émises par le parasite, font que la plante produise des dépôts gommeux qui obstruent les vaisseaux conducteurs y entravant ainsi le transport d'eau (KLOSTERMAN *et al.*, 2009) et donne des symptômes de flétrissement qui se déclenchent sur les parties aériennes atteintes (TOMBESI *et al.*, 2007 ; LAOUNE *et al.*, 2011).

A la fin du cycle d'infection, le champignon forme des microsclérotés dans les parties mortes de l'arbre. Cela permet le retour du champignon au sol et la reprise éventuelle d'un nouveau cycle infectieux (FRADIN et THOMMA, 2006 ; KLOSTERMAN *et al.*, 2009).

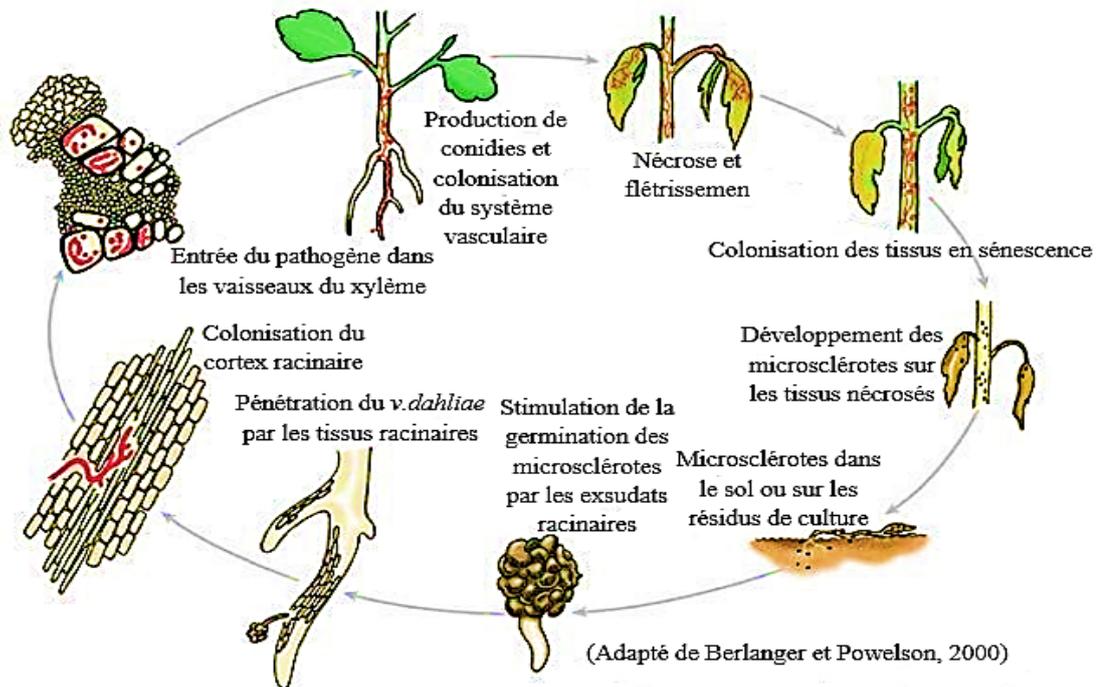


Figure 05 : Cycle de développement de la *V. dahliae*. (BERLANGIER et POWELSON, 2000).

II- 6- Le pouvoir pathogène

L'aptitude pathogénique d'un microorganisme s'évalue traditionnellement selon deux critères; l'un qualitatif, c'est sa virulence mettant en œuvre sa capacité à infecter les plantes, l'autre quantitatif c'est son agressivité, démontrant son influence ou non à intensifier les dégâts sur une plante sensible.

Dans une population de *V. dahliae* présentant les caractéristiques de virulence, les individus peuvent différer par leur niveau d'agressivité (BELLAHCENE, 2004).

L'agressivité de l'espèce *V. dahliae* vis-à-vis de l'olivier le partage en deux pathotypes ; défoliant (D) et non défoliant (ND), selon sa capacité à défolier la plante hôte (LOPEZ-ESCUADERO *et al.*, 2004 ; DERVIS *et al.*, 2007). Les isolats du pathotype (D) sont plus virulents que ceux du pathotype (ND) (BEJARANO-ALCAZAR *et al.*, 1996 ; LOPEZ-ESCUADERO et BLANCO-LOPEZ, 2007). Cependant il y a une difficulté pour déterminer la classification de *V. dahliae* en raison de l'absence de la forme spéciale, donc la distinction de groupes bien définis par différents critères est souvent délicate (BELLAHCENE, 2004).

II-7. Dégâts causés par le *verticillium* spp.

Le *Verticillium dahliae* est un agent pathogène tellurique très répandu et peut causer des pertes importantes dans une large gamme d'herbacés et lignées (HIEMSTRA et HARRIS, 1998 ; PEGG et BRADY, 2002).

Elle affecte de vastes zones oléicoles, surtout les nouvelles plantations qui sont réalisées dans les pays où la culture est en expansion ou bien dans les régions où des plans de restructuration de l'olivier traditionnel sont en cours. En général, elle affecte les oliveraies irriguées plus ou moins intensivement et localisées dans des zones irriguées complantées d'espèces sensibles à la maladie. Les dégâts se manifestent par un dessèchement des branches secondaires, des branches principales et parfois même de l'arbre complet (BELLAHCENE, 2004).

En Grèce, les pertes occasionnées par la maladie ont été évaluées entre 2 à 3%. En Andalousie, sur 122 exploitations inspectées avec un total de 350.000 arbres, 38.5% d'arbres étaient affectés avec une incidence moyenne de la maladie qui oscille entre 10 et 90% des arbres affectés. En Algérie, les dégâts occasionnés avoisinent les 12% (BELLAHCENE, 2004).

II-8. Gamme d'hôtes

Verticillium dahliae est un champignon très polyphage, il attaque une large gamme d'hôtes de genres et de familles botaniques éloignées (MESIAN et LAFON, 1970), dont la plupart ont un intérêt agricole et économique. Parmi ces espèces végétales, on rencontre : des arbres fruitiers à noyau (l'olivier, l'amandier, l'abricotier, le pêcher, le cerisier, le pistachier, le prunier, le noyer et l'avocatier), des arbres forestiers (hêtre et orme) et des plantes maraichères (pomme de terre, tomate, poivron, aubergine) ainsi que d'autres cultures (coton, houblon, concombre, melon, menthe et luzerne) (LUDBROOK, 1933; ENGELHARD, 1957;

PARKER, 1959; SMITH, 1965; HIMELICK, 1969; HARRISSON et ISAAC, 1969; SKADOW, 1969; RIEUF, 1970; VIGOUROUX, 1971, 1975; MCKEEN et THORPE, 1973; CARTER, 1975; PINEAU, 1976; PIEARCE et GIBBS, 1981; THANASSOULOPOULOS *et al.*, 1981b; SINCLAIR et HUDLER, 1984).

II-9. Gestion de la maladie

Compte tenu de la longévité des microsclérotés dans le sol, les pratiques culturales classiques: la rotation de culture (**STEVENS *et al.*, 1994**), la destruction des débris végétaux contaminés et des mauvaises herbes (**HENNI, 1982**), l'enfouissement des engrais verts et des amendements organiques avant la plantation, s'avèrent souvent difficile et sans grand effet (**WILHELM, 1951**). Quant aux méthodes de lutte physique, telle que la stérilisation à la vapeur ou la solarisation, elles sont très coûteuses (**KATAN, 1981 ; SAREMI *et al.*, 2010**).

II- 9- 1. La 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-LAPIERRE, 2011**) ou l'utilisation de fongicides systémiques (méthyl-thiophanate, thiabendazole, bénomyl, et carbendazime) (**HENNI, 1982; BOUKNEDEL, 2001; KUMAR *et al.*, 2012**). Ce recours aux produits chimiques, toujours valables dans certaines situations, engendrent cependant des coûts élevés et des impacts sur l'environnement (**NANNIPIERI *et al.*, 1990**). Actuellement aucun traitement curatif n'a prouvé son efficacité (**ARSLAN et DERVIS, 2010**).

II- 9- 2. La lutte biologique

Dans un contexte d'oléiculture durable, la lutte biologique peut offrir de nombreuses méthodes de lutte alternative au traitement chimique (**UPPAL *et al.*, 2008**). Ce moyen de lutte met en œuvre différents organismes vivants, appelés auxiliaires, ou leurs 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**).

Des études ont indiqué que certaines bactéries et extraits des plantes peuvent servir d'excellents agents de lutte biologique contre certains pathogènes telluriques (**PEGG et BRADY, 2002 ; MERCADO-BLANCO *et al.*, 2004 ; ARFAOUI *et al.*, 2007**). Comme pour les

produits de lutte chimique, on peut distinguer chez les microorganismes des effets directs sur l'agent pathogène, des effets sur la pathogénèse et des effets indirects par l'intermédiaire de la plante (NICOT, 2002). Ce moyen de lutte à malheureusement dévoilé un succès limité contre la verticilliose (SANEI *et al.*, 2010).

II- 9-3. La lutte génétique

Vu la pérennité de l'olivier et l'aptitude du parasite à survivre dans le sol et de se disperser facilement, la lutte génétique par l'utilisation des variétés résistantes demeurerait le moyen économiquement le plus efficace pour combattre ce fléau (MA, 2003 ; LIU *et al.*, 2012).

Plusieurs chercheurs ont essayé de sélectionner des variétés résistantes, ou tolérantes telles que les variétés Frantoio, Fragivento et Coratina d'origine italienne (CIRULLI *et* MONTEMURRO, 1976), ainsi qu'Arbequina et Empeltre d'origine espagnole (CIVANTOS, 1999).

II-9-4. La lutte intégrée

La prise de conscience des limites des méthodes chimiques, biologiques et génétiques contre cette trachéomyose a incité les chercheurs européens à s'orienter vers le développement de la lutte intégrée. Cette lutte consiste dans l'emploi combiné et raisonné de toutes les méthodes (culturale, physique, chimique, biologique et génétique), pour réduire l'inoculum du champignon de façon efficace et maintenir les dégâts à un seuil économiquement tolérables, tout en respectant l'environnement (LOPEZ-ESCUDERO *et* MERCADO-BLANCO, 2010 ; BUBICI *et* CIRULLI, 2011).

Chapitre III-les composés phénoliques

Les polyphénols sont des molécules synthétisées par les végétaux lors du métabolisme secondaire pour se défendre contre les agressions environnementales. Ils sont localisés dans différentes parties des plantes selon l'espèce végétale et le groupe polyphénoliques considérés. Ces composés regroupent une multitude de molécules et représentent l'un des groupes les plus importants présents dans le règne végétal (**DANGLES et al., 1992**).

III-1-les composés phénoliques de défense constitutive

Les systèmes de défense préventifs sont des barrières préformées qui peuvent être de nature physique ou chimique. Les défenses constitutives physiques constituent une barrière mécanique difficile à franchir par les micro-organismes pathogènes. Dans ce cas, la morphologie de la plante limite la progression des pathogènes. La cire, la cutine ainsi que la subérine sont des exemples de composés qui forment des structures physiques qui bloquent la pénétration ou empêchent efficacement la progression des micro-organismes parasites. (**ELMODAFAR, 2002**). Les barrières chimiques sont généralement des molécules solubles naturellement toxiques vis-à-vis des micro-organismes et des champignons parasites. On appelle phytoanticipines, ces molécules constitutives de faible poids moléculaires qui présentent ce caractère antibactérien ou antifongique (**ELMODAFAR, 2002**).

III-2-les composés phénoliques de défense induite

Le terme phytoalexine désigne les métabolites secondaires de faible poids moléculaire formés par la plante suite à une infection et possédant, entre autre, une activité antimicrobienne marquée. Les composés phénoliques de défense induite sont par définition des phytoalexines, cependant toutes les phytoalexines ne sont pas des composés phénoliques. Une grande variété de métabolites secondaires, dont de nombreux alcaloïdes et terpènes, répondent à cette définition. La frontière n'est pas toujours claire et une dualité existe dans la terminologie entre phytoalexine et phytoanticipine. On distingue deux groupes principaux de phytoalexines phénoliques: les stilbènes d'une part et les flavonoïdes d'autre part (**EL MODAFAR, 2002**).

III-3-Classification des polyphénols

Selon **EL MODAFAR (2002)**, Les polyphénols possèdent plusieurs groupements phénoliques avec ou sans autres fonctions (alcooliques, carboxyles...). Dans cette famille de

molécules, se trouvent de nombreuses substances, qui peuvent se classer selon leur structure en trois groupes principaux:

III-3-1-- Les acides phénols

Les acides phénols, ou acides phénoliques, ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols. Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature. Ils se divisent en deux catégories : Les acides phénols dérivés de l'acide benzoïque sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinée à l'état d'esters ou d'hétérosides (**HASLAM 1994**). Exemple : l'acide gallique qui est un élément principal de la structure des tannins hydrolysables (**Figure 06**).

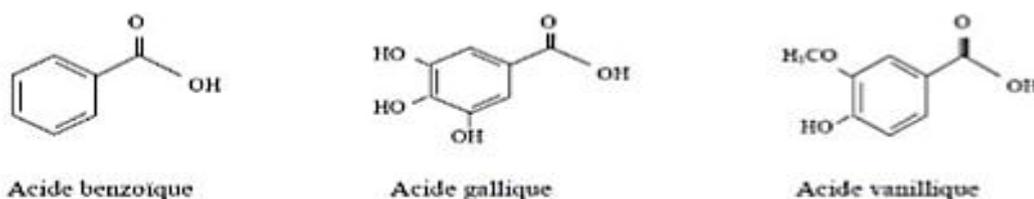


Figure 06 : exemple de quelques acides phénols (**BRUNETON 2009**).

Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique sont souvent estérifiés. Les plus courants sont l'acide cinnamique, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide p-coumarique et l'acide synaptique (**HASLAM 1994**).

III-3-2- Les flavonoïdes

L'appellation «flavonoïdes» rassemble une très large gamme de composés polyphénoliques formés par un squelette de base à 15 atomes de carbones. Ces composés représentent le groupe de composés phénoliques le plus diversifié: plus de 4000 flavonoïdes ont déjà été identifiés (**SARNI-MANCHADO et CHEYNIER 2006**).

Le terme « flavonoïde » est dû à leur couleur jaune (= flavus en latin) qu'ils engendrent. D'ailleurs, leurs fonctions principales chez les végétaux semblent être attribuées à leur coloration; au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bêtaïnes.

Les flavonoïdes sont présents dans différentes parties des végétaux supérieurs selon le type de l'espèce: racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, graines, bois...etc (**MUKESH, 2005**).

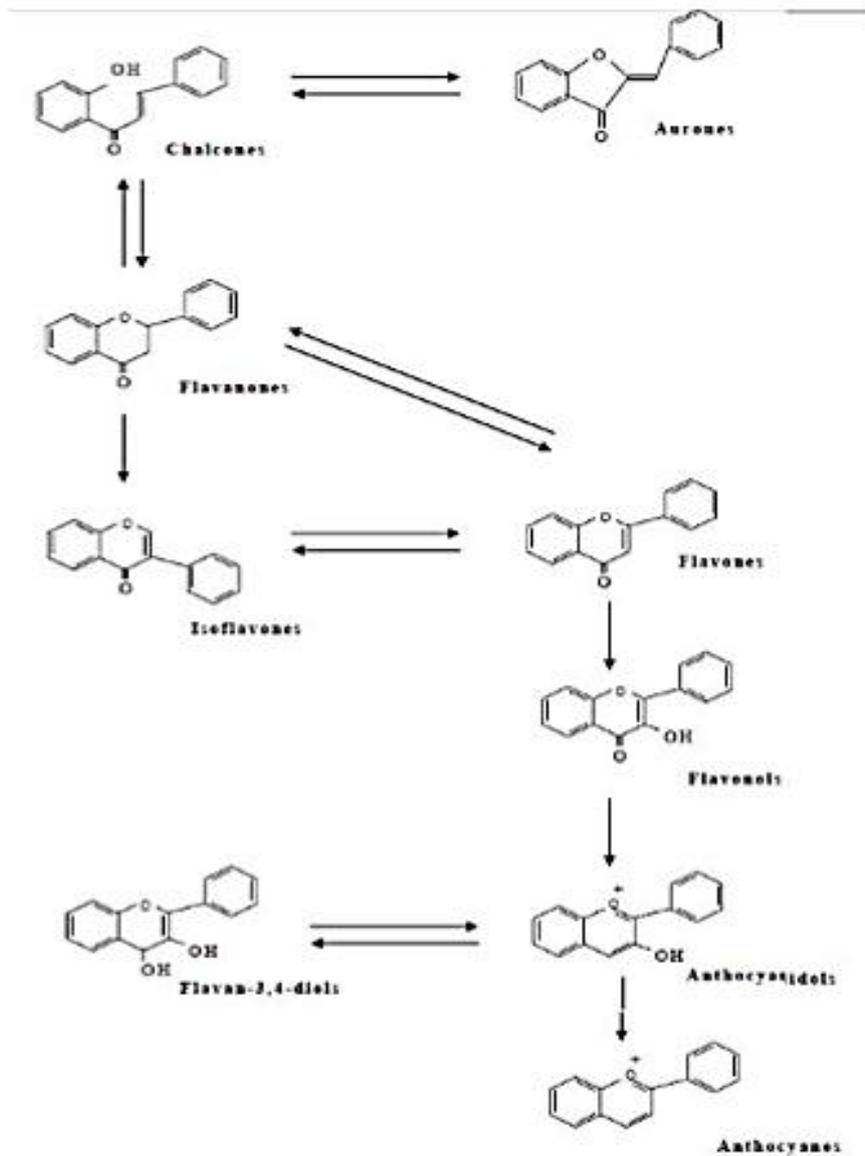


Figure 07 : différentes classes de flavonoïdes.

III-4- la sauge

D'après la 1ère histoire, une variété de sauge appelait « Chia » était cultivée par les mexicains. Les grecs, les romains et les arabes ont utilisé la sauge comme tonique, et en compresse contre les morsures de serpent. Au 18^{ème} siècle, les feuilles de la sauge ont été roulées comme des cigarettes pour les fumer contre l'asthme et surtout au printemps (Anonyme, 2010).

Salvia est une plante annuelle et biennale d'origine méditerranéenne de la famille des labiées (DJERROUMI et NACEF 2004). Il existe environ 900 espèces identifiées autour du monde (MAKSINOVIC et al., 2007; LONGARAY et al., 2007). En Algérie les espèces qui ont été déterminées sont dans l'ordre d'une trentaine. Plusieurs appellations ont été données à la sauge. Selon Ibn El Beytar, les andalous la nomment "essalma" qui ajoute qu'elle est appelée "salbia" par les botanistes en Espagne. El djazairi indique l'expression "souek ennebi" comme synonyme de Saleme.

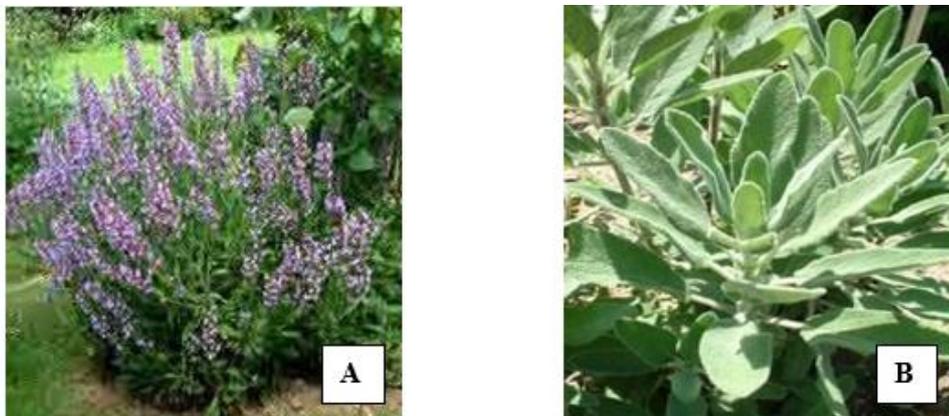


Figure 08 : Aspect générale de la sauge

A: Arbuste de la sauge (fleurs et feuilles)

B : les feuilles de sauge

1- Description morphologique

Cette plante vivace à tige ligneuse à la base, forme un buisson dépassant parfois 80cm, rameaux vert-blanchâtre. Les feuilles sont assez grandes, épaisses, vert-blanchâtres, et opposées. Les fleurs bleu-violacé clair en épis terminaux lâches, sont disposées par 3 à 6 en verticilles espacés. Le Calice est campanulé à 5 dents longues et corolle bilabée supérieure en casque et lèvre inférieure trilobée ; le fruit est en forme de tétrakènes (HANS, 2007)

2- Classification taxonomique :

La sauge suit la classification suivante

Règne.....	Plantae
Division.....	Magnoliophyta
Classe.....	Magnoliopsida
Ordre.....	Lamiales
Famille.....	Lamiaceae
Genre.....	<i>Salvia</i>
Espèce.....	<i>Salvia officinalis L.</i>

3- Usage traditionnel de la sauge

La sauge est une des plantes les plus utilisées, vu ses propriétés importantes; elle est considérée comme un stimulant pour les gens anémiques, aussi pour les personnes stressées et déprimées, et conseillée pour les étudiants en période d'examen.

Pour usage externe, elle est appliquée en gargarisme contre les inflammations de la bouche, les abcès, et aussi pour le nettoyage et la cicatrisation des plaies (**DJERROUMI et NACEF 2004**).

Les infusions de la sauge sont appliquées pour le traitement de plusieurs maladies de la circulation sanguine et les troubles digestifs ainsi que les problèmes du système nerveux (**RADULESCU et al., 2004**). Cette herbe aromatique est employée dans la cuisine, pour son goût puissant, légèrement amer et camphré (**DULING, 2007**).

4- Les composés phénoliques de la sauge rapportés

Tableau 06 : les composés phénolique de la sauge.

Polyphénols	Auteurs
<u>Acides phénols</u>	
4-Hydroxybenzoïque acide	WANG et al 2000
3-Methoxy-4-hydroxybenzoïque acide (acide vanillique)	CUVELIER et al 1996
acide férulique	CUVELIER et al 1996
acide rosmarinique	CUVELIER et al 1996; WANG et al 1998
acide salvianolique	ZHANG and Li 1994
cis-p-Coumarique acide 4-(2-apiosyl)	LU and FOO 2000
glucoside trans-p-Coumarique acide 4-(2-piosyl)glucoside	LU and FOO 2000
	WANG et al 1998

6-Feruloyl-a-glucose	WANG et al 1998
6-Feruloyl-b-glucose	WANG et al 1998
1-(2,3,4-Trihydroxy-3-methyl)butyl-6 feruloylglucoside	
6-Caffeoyl-1-fructosyl-a-glucoside	WANG et al 1998
1-Caffeoyl-6-apiosylglucoside	WANG et al 1998
1-p-Hydroxybenzoyl-6-apiosylglucoside	WANG et al 1998
<u>Les flavonoïdes</u>	
<u>Flavones</u>	
5,7,40-Trihydroxyflavone (apigenine)	SAGDULLAEVA et al 1972; CUVELIER et al 1996
-7-Methyl ether (genkwanine)	BRIESKORN and BIECHELE 1971; CUVELIER et al 1996
-7,40-Dimethyl ether(acacetine)	CUVELIER et al 1996
5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavone (luteoline)	BRIESKORN and BIECHELE 1971
<u>Flavonols</u>	
Quercétine	KENJERIC et al 2008
<u>Flavanones</u>	
5,7,30-Trihydroxy-40-methoxyflavanone (hesperetine)	CUVELIER et al 1996
<u>Flavone glycosides</u>	
Apigenine-7-glucoside (cosmosiine)	MASTEROVA et al 1989
Luteoline-7-glucoside (cinaroside)	WANG et al 1998; LU and FOO 2000
-7-Glucuronide	LU and FOO 2000, LIMA et al 2007

Chapitre I–Matériel et méthodes

I-1- Objectif

Notre étude traite deux parties ; La première traite l'étude de l'effet de quelques facteurs abiotiques sur la croissance mycélienne et la sporulation de deux isolats de *Verticillium* sp. ; La seconde vise l'évaluation de l'effet d'un extrait méthanoïque de *Salvia officinalis* :

In vitro : sur la croissance mycélienne et la sporulation des deux isolats de l'agent pathogène *Verticillium* sp.

In vivo : sur le développement de la maladie sur plants de tomate inoculé par l'agent pathogènes, préalablement traités par cet extrait.

I-2-Matériel biologique

Les deux isolats de *Verticillium* sp. utilisés dans cette étude, ont été isolés par Monsieur Mahiout D. enseignant chercheur au laboratoire de protection des végétaux à partir de deux sites différents.

1-2-1- Purification et conservation des isolats

Les champignons isolés sont fréquemment contaminés par les bactéries et autres champignons. Ceux-ci restent parfois invisibles et modifient les caractères et le mode de croissance des colonies recherchées. Afin d'éviter ce risque, le procédé le plus simple et le plus sûr reste celui de la culture mono spore (RAPPILY, 1968; ZERROUK, 1994).

L'obtention de culture monospore s'effectue par deux techniques, soit à partir d'un apex de jeune mycélium quand la souche ne sporule pas, soit en prélevant une seule spore (RAPPILY, 1968, ZERROUK, 1994 in SAIAH, 2004).

Du moment que *Verticillium* sp., sporule nous avons utilisé la deuxième méthode qui consiste à préparer une suspension de spores d'une colonie pure cultivée sur milieu P.D.T. Des dilutions sont réalisées 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , avec un volume finale de 10 ml pour chaque tube; les dilutions utilisés étaient 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} , la suspension de spores ainsi préparée estensemencée à raison de 0,1ml pour chaque tube sur des boîtes de Petrie. Après 3 ou 4 jours d'incubation à 24°C, les jeunes colonies issu d'une conidie sont repérés et prélevé et ensemencer sur boîte de Petri (RAPPILY, 1968). Les isolats monoconidiens sont conservés sur tube à essai contenant le milieu P.D.T inclinés pour des utilisations ultérieures.

I-3-Etude de l'influence de quelques facteurs abiotiques sur le comportement « *in vitro* » de *Verticillium sp.*

I-3-1- Influence de quelques milieux de culture

I-3-1-1- Choix des milieux de culture

Le choix des milieux de culture pour tout parasite dépend de ses exigences nutritionnelles (Rappily, 1969). Nous avons testé les deux isolats de *Verticillium sp.* sur différents milieux, afin de déterminer le milieu nutritif le plus favorable en estimant la croissance mycélienne et la sporulation sur chaque milieu. Quatre milieux sont retenus: P.D.A, P.D.T, Carotte et Richards. Les compositions respectives de ces milieux sont présentées en annexe 01.

I-3-1-2- Méthode :

Après stérilisation et répartition des milieux dans des boîtes de Pétri à raison de 15ml par boîte, l'ensemencement se réalise avec des explants de 5 mm de diamètre, prélevés de la périphérie d'une culture âgée de 15 jours, à l'aide d'un emporte-pièce stérile. Ces explants sont déposés au centre de la boîte de Pétri. Trois répétitions sont retenues pour chaque isolat et chaque milieu.

Les 24 boîtes sont déposées à l'obscurité dans l'incubateur à 24°C. L'expérience s'achève lorsque l'une des boîtes est complètement recouverte. Des observations sur les caractères cultureux sont effectuées parallèlement aux mensurations.

Pour l'estimation de la croissance mycélienne, la technique employée est celle décrite par Brewer (1960) et LEACH (1962) in LOUBELO (1992), qui consiste à mesurer la croissance linéaire et diamétrale des colonies en les appliquant à la formule suivante :

$$L = \frac{D-d}{2} \quad \text{Où :}$$

L : croissance mycélienne

D : diamètre de la colonie

d : diamètre de l'explant

Afin d'établir la vitesse de croissance en fonction du temps, des mesures journalières du diamètre de la colonie sont effectuées (RAPPLY, 1969).

Alors que la sporulation est estimée par la méthode décrite par KAISER (1972) in SAIAH (1996) qui consiste à broyer et macérer dans 10 ml d'eau distillée stérile, une culture âgée de 24 jours. Après agitation et filtration sur mousseline fine stérile, afin de retenir des fragments mycéliens, la numération des spores se fait à l'aide de la cellule Mallassez.

I-3-2- Influence de la température

Pour l'étude de l'influence de la température sur le développement de nos isolats, on a retenu le milieu P.D.T, qui a assuré la meilleure croissance mycélienne et une sporulation abondante. La gamme de températures étudiées est 18°C, 20°C, 22°C et 25°C. Les étapes de l'estimation de la croissance mycélienne et la sporulation sont identiques à celle employées dans le test des milieux de culture.

I-3-3- Influence de l'humidité relative

Pour cette étude, il convient de préparer différents niveaux d'humidité par la méthode décrite par SOLOMEN (1951) in LOUBELO (1991). Le tableau 07: récapitule les différentes gammes d'humidités étudiées.

Tableau 07: Quantité de produit à utiliser (SOLOMEN (1951) in LOUBELO (1991)).

Produit utilisés	Poids du produit (g)	Quantité d'eau distillée (ml)	Humidité relative (%)
Hydroxyde de potassium (KOH)	100	100	14
	50	100	50
Chloride de sodium (NaOH)	32	100	80
	0	100	100

Après la préparation du milieu P.D.T, sa répartition dans les boites de Pétri et l'ensemencement des explants de 5 mm de diamètre ; les boites sont retournées, couvercle en bas 10 ml de chaque concentration y est versée de façon à avoir 3 boites par concentration pour chaque isolat, c'est-à-dire par niveau d'humidité.

Les mesures de la croissance mycélienne et l'estimation de la sporulation sont identiques à celle décrites dans l'étude des milieux de culture.

I-3-4- Influence du pH

Dans le but d'apprécier le pH sur la croissance mycélienne et la sporulation des deux isolats de *V. dahliae*, on a essayé une gamme de pH allant de 4,1 à 8,1 selon la méthode décrite par SOLOMEN (1951) in LOUBELO (1992). Pour cela on a préparé le milieu P.D.T qu'on a réparti dans des erlenmeyers de 100ml, où on a ajouté des quantités de Hcl (4 N) et NaOH (4 N) selon le tableau 08.

Tableau 08 : Quantité d'Hcl et de NaOH nécessaire pour obtenir la gamme de pH allant de 4,1 à 8,1 (SOLOMEN (1951) in LOUBELO (1992)).

Valeur du pH	Hcl (4N) ml	NaOH (4 N) ml
4,1	2	0
5.1	0	0
6.8	0	3
8,1	0	5

Pour obtenir les valeurs de pH correspondant, chaque pH obtenu est contrôlé à l'aide d'un pH mètre pour une éventuelle correction. Après autoclavage des milieux tamponnés, on a suivi les mêmes étapes pour l'évaluation de la croissance mycélienne et la sporulation que celle du test des milieux de culture.

I-4- Evaluation de l'activité antifongique de l'extrait méthanoïque de *Salvia officinalis* vis-à-vis de *verticillium* sp.

I-4-1- Matériel végétal

Les feuilles de sauge (*Salvia officinalis*) constituent le matériel végétal utilisé comme source de composées phénoliques, utilisé pour évaluer un éventuel effet inhibiteur de la croissance mycélienne et sporulation de *Verticillium* sp. (fig :09). Ainsi que tester son effet biofongicide "*in vivo*".

Les échantillons sont prélevées à partir d'un arbuste se trouvant au niveau du jardin du site 3 (ex ITA) de l'université de Mostaganem; elles sont séchées à l'étuve à 35°, puis conservés à l'abri de la lumière et de l'humidité.



Figure 09: poudre et feuilles séchées de la sauge (Originale, 2016).

I-4-2- Procédés d'extraction

I-4-2-1- Extraction Soxhlet

L'extraction des composés phénoliques est réalisée en utilisant le dispositif Soxhlet (Planche: 1), un échantillon de 4g de poudre sèche est placé dans un récipient contenant 40 ml d'éther de pétrole, et laissé sous agitation à la température ambiante. Le mélange est ensuite transféré dans une cartouche en papier filtre épais pour enfin être placées dans le réservoir de l'extracteur soxhlet. Au cours du premier cycle d'extraction le solvant (400 ml de méthanol) contenant la matière à extraire retourne dans le ballon par déversements à travers le siphon situé dans le coude latéral. Après plusieurs cycles successifs d'extraction en continu, l'extrait récupéré est concentré par évaporation à sec à une température de 40°C à l'aide d'un rotavapeur (Planche : 1), le résidu récupéré est solubilisé dans de l'acétone dilué à 70% à raison de 1/10 (JORDAN *et al.*, 2009).

L'opération est répétée plusieurs fois dans le but d'avoir un volume suffisant pour effectuer les tests "*in vitro*" et "*in vivo*" prévus. L'extrait obtenu est conservé à l'obscurité à 4°C.

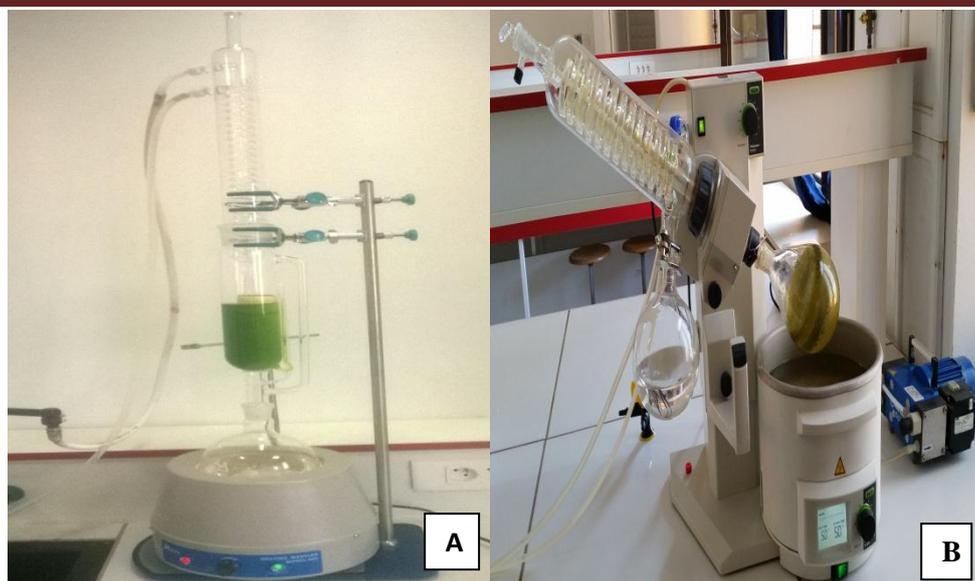


Planche 01: Dispositifs d'extraction (Originale, 2016).

A : Montage Soxhlet

B : Montage rotavapeur

I-4-2-2- Préparation des dilutions des composés phénoliques

L'extrait est solubilisé dans des volumes variables d'eau distillée stérile en vue d'obtenir un mélange homogène à différentes concentrations (0% (témoin), 25%, 50%, 75% et acétone (comme témoin positif)).



Figure 10: dilution du composé phénolique

I-5- Evaluation de l'activité antifongique "in vitro" de l'extrait méthanoïque de *Salvia officinalis* vis-à-vis de *verticillium* sp.

1.5 ml de chaque dilution de l'extrait méthanoïque est ajouté aseptiquement à 13.5 ml de milieu de culture P.D.T. Après solidification, chaque boîte est inoculée à l'aide d'un disque mycélien de 5 mm de diamètre provenant du front de croissance des cultures âgés de deux semaines. Les boîtes sont incubées à 23°C, trois répétitions sont retenues pour chaque concentration.

I-5-1- Action sur la croissance mycélienne :

L'estimation de la croissance mycélienne est identique à celle utilisé pour les tests pour étudier l'effet des facteurs abiotiques sur le comportement *in vitro* des isolats de *Verticillium* sp.

I-5-1-1- Evaluation du taux d'inhibition de la croissance mycélienne

Les résultats obtenus à partir de l'estimation de la croissance mycélienne sont exprimés en pourcentage (%) par rapport à la croissance mycélienne du témoin selon la formule de DOUMBOUYA *et al.*, (2012).

$$\text{Ti \%} = [(D_T - D) / D_T] \times 100 \quad \text{Où :}$$

Ti % : taux d'inhibition de la croissance mycélienne

D_T : diamètre moyenne de la croissance mycélienne du champignon (en cm) dans la boîte pétri sans extrait (témoin)

D : diamètre moyenne de la croissance mycélienne du champignon dans la boîte pétri qui contient la dilution préparée

I-5-1-2- Evaluation du taux d'inhibition de la sporulation

La sporulation est estimée selon la méthode décrite par KAISER (1972) in SAIHAH (1994) qui consiste à broyer et à macérer dans 10 ml d'eau distillée stérile, une culture le dernier jour du test de l'évaluation de la croissance mycélienne. Pour notre cas la culture est âgée de 24 jours.

Après agitation et filtration sur mousseline fine stérile, afin de retenir les fragments mycéliens, la numération des spores se fait à l'aide d'une cellule de Mallassez.

Le pourcentage d'inhibition de la sporulation (PIs%) par rapport au témoin, est calculé comme suit :

$$PIs\% = [(N_0 - N_C) / N_0] \times 100$$

Où :

PIs% : pourcentage d'inhibition de la sporulation (%).

N_0 : nombre de spores estimées chez le témoin.

N_C : nombre de spores estimées en présence de l'extrait.

I-5-2- Evaluation de l'activité antifongique "in vivo" de l'extrait méthanoïque de *Salvia officinalis* vis-à-vis de *verticillium* sp.

Le but de ce test est d'étudier et d'apprécier l'effet de l'extrait polyphénolique des feuilles de la sauge sur le niveau de la maladie de la tomate.

I-5-2-1- Obtention des plantules de tomate

Le test in "vivo" pour estimer l'efficacité de l'extrait polyphénolique a été effectuée sur deux variétés de la tomate (Florida et Ouzna).

Après deux semaines de germination des graines au niveau des alvéoles, les plantules des deux variétés de tomate sont plantées dans des pots en plastique contenant du terreau. Le fond de ces pots a été percé de quelque trou pour faciliter le drainage lors des arrosages.

Les plants sont maintenus dans une serre, et arrosés deux fois par semaine avec l'eau de robinet, jusqu'au stade requis à l'inoculation.

La conduite de l'essai est effectuée selon un dispositif expérimentale en randomisation totale, trois facteurs sont retenue, la variété de tomate, l'isolat du pathogène et le traitement. 5 plants sont retenus pour chaque variante de traitement.

- 5 plants pour chaque variété témoin eau.
- 5 plants pour chaque variété témoin acétone.
- 5 plants pour chaque variété traités par l'extrait polyphénolique dilué à 25%.
- 5 plants inoculés par l'agent pathogène «*Verticillium* sp.1», pour chaque variété.
- 5 plants inoculés par l'agent pathogène « *Verticillium* sp.2 », pour chaque variété.
- 5 plants inoculés par l'agent pathogène « *Verticillium* sp.1 » pour chaque variété après 3 jour de traitement par l'extrait polyphénolique à 25%.
- 5 plants inoculés par l'agent pathogène «*Verticillium* sp.2 » pour chaque variété après 3 jour de traitement par l'extrait polyphénolique à 25% . :

I-5-2-2- Traitement préventif de l'extrait méthanoïque des feuilles de sauge sur plantules de tomate

Les plantules de tomate au stade trois feuilles, âgés de 40 jours, sont délicatement retirée de leur pot puis leur système racinaire est lavée à l'eau de robinet. Ensuite on réalise un trempage pendant 15 min dans l'extrait des feuilles de la sauge. Les racines des plantules témoins sont trempés dans de l'eau distillée stérile et d'autres sont trempés dans de l'acétone à 70%. Toutes les plantules (traitées à l'extrait et témoins) sont de nouveau plantés dans le même substrat.

Juste après le traitement, on pulvérise sur les plantules un engrais de démarrage (Start sol NPK 124210 + 2% Mgo + OE).

I-5-2-3- L'inoculation de l'agent phytopathogène

L'inoculum fongique a été préparé selon la méthode de ROUHANI (1979) à partir des précultures âgées de 15 jours, en boîtes de Pétri sur milieu P.D.T. La surface de la colonie est inondée par 10 ml d'eau distillée stérile puis détachée du milieu de culture par un léger grattage à l'aide d'une pipette Pasteur. La suspension mycélienne est ensuite filtrée à travers 4 couches de mousseline autoclavée, pour éliminer les débris du mycélium et du milieu de culture et obtenir une suspension conidienne. Après agitation de la suspension sporale à l'aide d'un vortex, la concentration en conidies est estimée à l'aide de la cellule de Malassez (Annexe 02) et ajustée à 10^6 conidies / ml.

L'inoculation d'une quantité de 4 ml de la suspension sporale, se fait 3 jours après le traitement avec l'extrait méthanoïque de la sauge au niveau des racines. Des témoins inoculés non traité et d'autres sains sont réalisés.

Les plantules témoins ont reçu à la place de l'inoculum de l'eau distillé stérile, et d'autres, 4 ml d'acétone à 70 % (Planche 02)

L'évaluation des symptômes de la maladie est réalisée 20 jours après l'inoculation des plants.

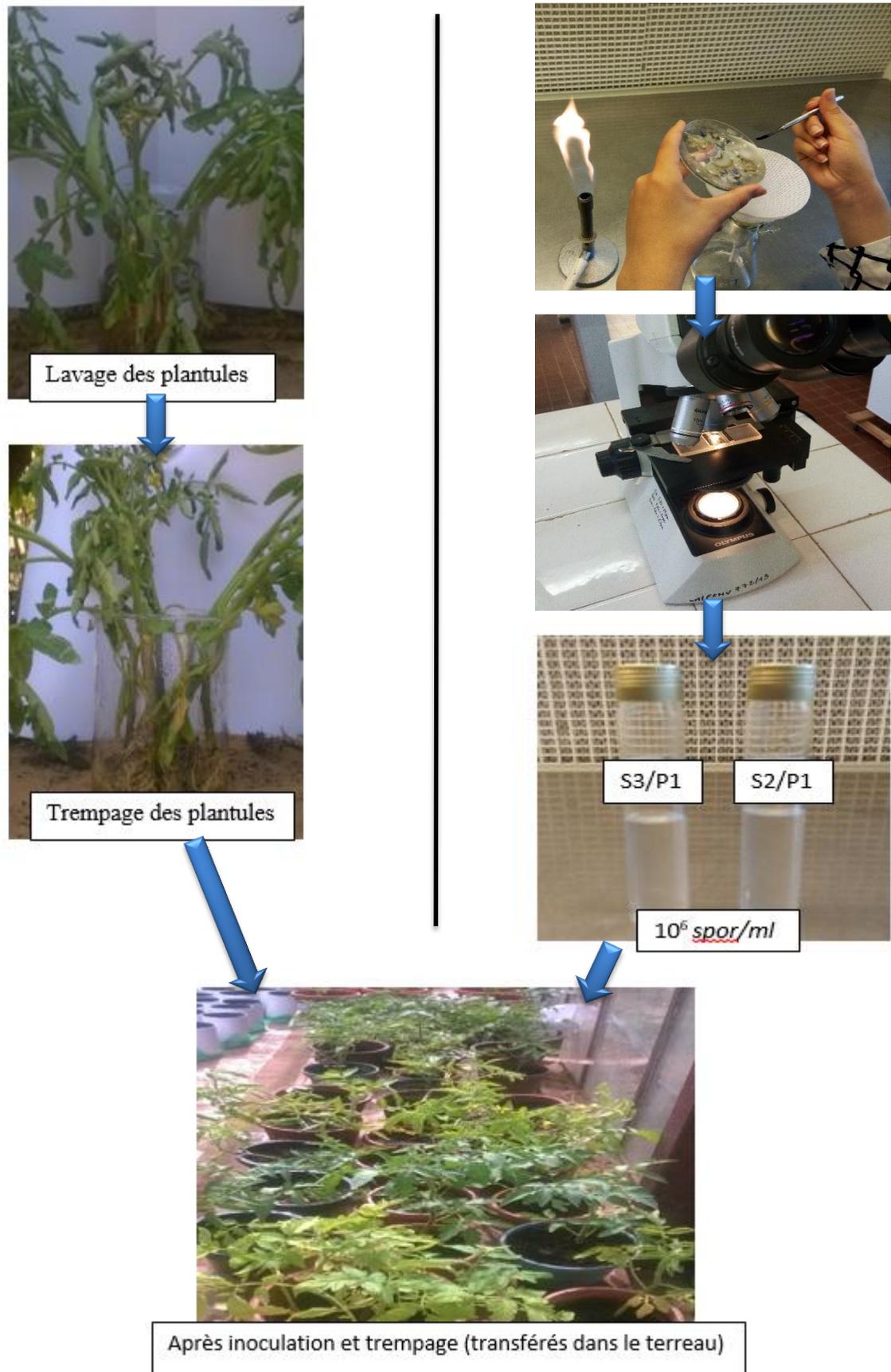


Planche 02 : les différents étapes de trempage racinaire et inoculation des agents phytopathogènes.

I-5-2-4- Notation des symptômes

Les plantules testées sont observées quotidiennement, la lecture finale intervient le 20^{ème} jours.

Les symptômes induits par les isolats sur les plants de tomate incluent un rabougrissement, une chlorose, nécrose ou altération de la tige, une sénescence précoce des feuilles, un flétrissement et même une défoliation. Au cours de notre expérimentation nous avons remarqué en plus des symptômes décrits ci-dessus, des chloroses atypiques de l'attaque de *Verticillium* sp., spécialement sur les feuilles traités à l'extrait. Pour cela nous avons préféré utiliser l'indice de maladie décrit par BEYE et LAFAY (1985), basé sur la progression foliaire, au lieu de l'indice d'altération foliaire faisant intervenir les symptômes, principalement des chloroses, spécifiquement sur feuilles.

La progression des différents symptômes est décrite de la base vers le sommet de la tige une note est attribuée à chaque plante, en fonction de la hauteur atteinte, selon l'échelle:

- 0 : plante sans symptôme foliaire
- 1 : un des symptômes foliaires entre le collet et le 1/5 de la hauteur de la plante
- 2 : Symptômes jusqu'aux 2/5 de la hauteur
- 3 : Symptômes jusqu'aux 3/5 de la hauteur
- 4 : Symptômes jusqu'aux 4/5 de la hauteur
- 5 : Symptômes sur toute la hauteur ou plante morte.

La réaction moyenne globale des plantules est quantifiée à l'aide d'un indice de maladie calculé par le rapport suivant :

$$I.M = \frac{0 \times F1 + 1 \times F2 + 2 \times F3 + 3 \times F4 + 4 \times F5 + 5 \times F6}{N}$$

I.M : Indice de la maladie

F : Nombre de plants pour chaque degré dans l'échelle de notation allant de 0 à 5.

N : Nombre total de plants utilisés.

Selon CABRERA et al. (1987) ; LECHAPPE et al. (1988) ; CLULOW et al. (1991) et BEYE et LAFAY (1985), la sensibilité ou la résistance des plants est définie par cet indice :

Si $I M < 3$, le cultivar est résistant

Si $3 \leq I M < 5$, le cultivar est moyennement résistant

Si $I M > 5$, le cultivar est sensible

Analyse statistique

Le traitement de toutes les données "*in vitro*" a été réalisé à l'aide de Microsoft Office Excel pour le classement des données brutes et pour l'élaboration des graphes. L'analyse de variance et la comparaison des moyennes (test de Newman-Keuls) ont été effectuées par l'utilisation du logiciel Stat box version 6.4.

II-1-Caractère morphologique des deux isolats de *Verticillium*

II-1-1- Etude de l'aspect macroscopique

Après 6 à 7 jours de culture sur milieu P.D.T, les colonies de *Verticillium* sp.1 et *verticillium* sp.2 présentent un mycélium blanc et dense plus ou moins cotonneux, il devient ensuite crème à brun foncé puis noir après 10 à 11 jours de culture en raison d'une abondante production de micro-sclérotés (figure 11).



Figure 11 : Aspect macroscopique de *Verticillium* sp.

II-1-2- Etude de l'aspect microscopique

Les deux isolats produisent des conidies plus ou moins allongées et des microsclérotés en grande quantité. L'identification des espèces de *Verticillium* sp., est réalisé en se référant au manuel de BARNETT et HUNTER (1972). Elle est basée sur les caractéristiques morphologiques des hyphes et des organes de reproduction asexuée. Les observations microscopiques ont montré la présence d'hyphes mycéliens ramifiées et des conidiophores portant des phialides verticillées par groupe de trois, par des conidies plus ou moins arrondies à leur extrémité (figure 12). Des micro-sclérotés en amas sont également observés (JABNOUN-KHIEARDINE *et al.*, 2010 ; LOLA *et al.*, 2011 ; KUMAR *et al.*, 2012).



Figure 12 : Aspect microscopique de *Verticillium* sp1.

II-2- Influence de quelques facteurs abiotiques sur le comportement « *in vitro* » de deux isolats de *Verticillium* sp.

II-2-1- Influence de quelques milieux de culture sur la croissance mycélienne et la sporulation de *Verticillium* sp.

Les résultats du test sont représentés sur les figures 13 et 14. L'analyse de variance ($p < 0.01$) de l'ensemble des résultats a montré que la croissance mycélienne diffère significativement entre les deux isolats et d'un milieu à culture à l'autre.

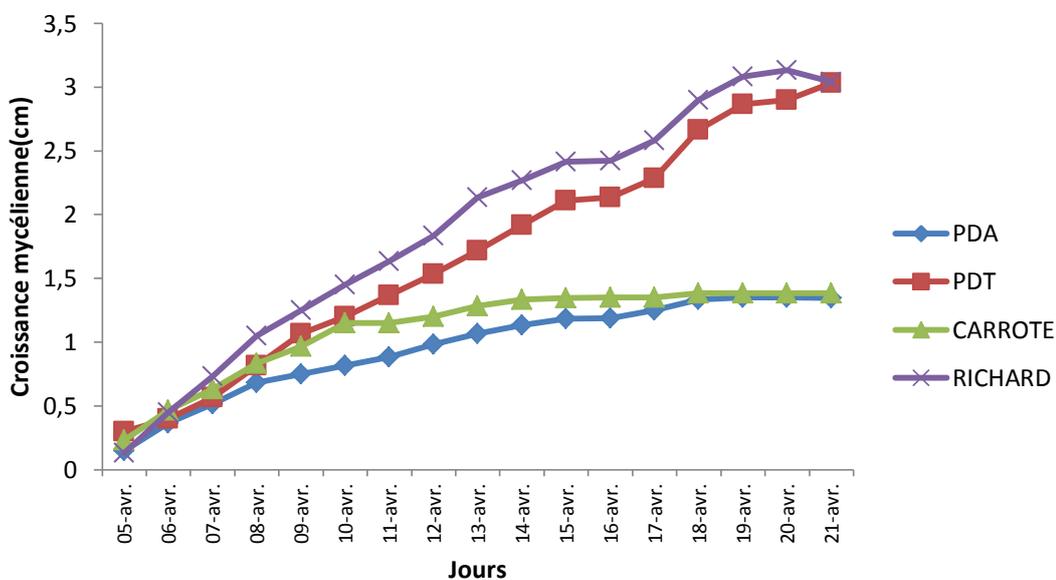


Figure 13 : Influences des différents milieux de culture sur la croissance mycélienne de l'isolat de *Verticillium* sp.1

La figure 13, représente la croissance mycélienne de *Verticillium* sp.1 cultivé sur les quatre milieux de cultures différents ; les résultats obtenus montrent une différence significative entre les milieux de culture. Et montrent que le milieu le plus favorable à la croissance mycélienne est Richards, suivi de près par le milieu P.D.T. La croissance mycélienne des deux autres milieux était significativement inférieurs.

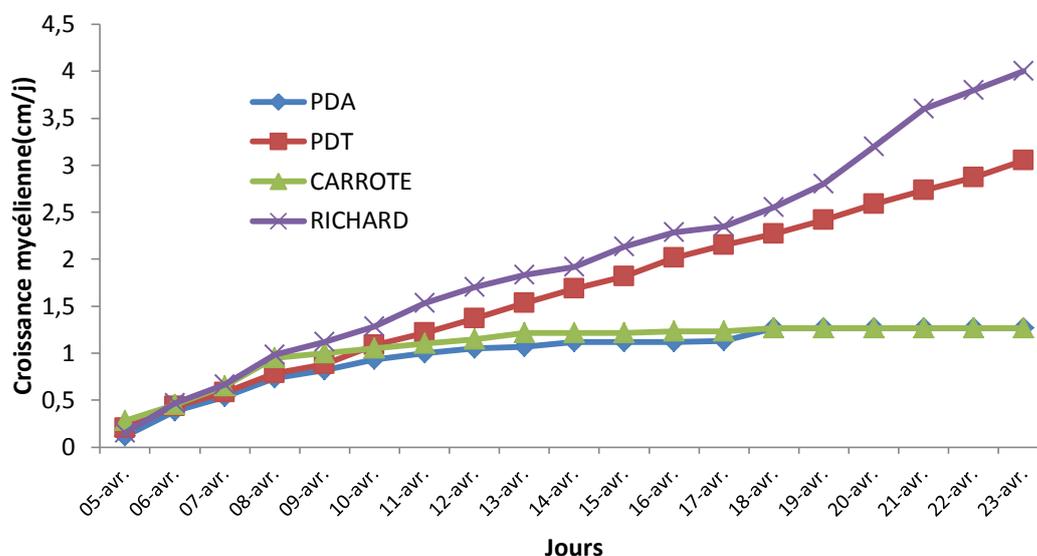


Figure 14 : Influences des différents milieux de culture sur la croissance mycélienne de l'isolat *Verticillium* sp.2.

La croissance mycélienne de l'isolat *Verticillium* sp.2 sur différents milieux montre que le milieu Richards est également le milieu le plus favorable, suivi de près par le milieu P.D.T. Les deux autres milieux se sont comportés de la même manière, et leur croissance était nettement inférieure.

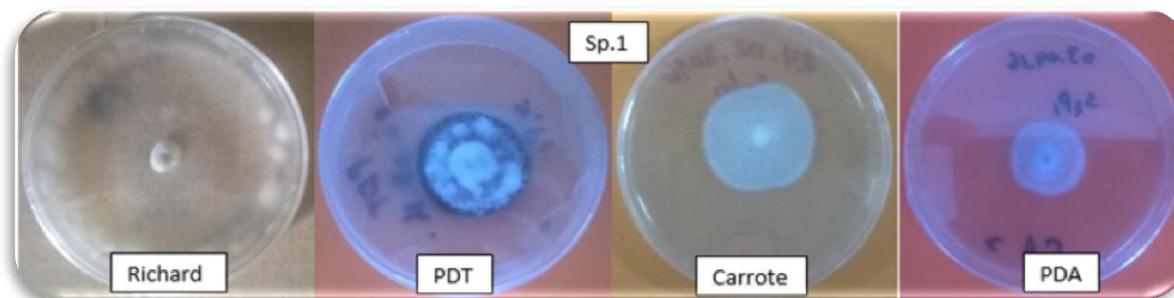


Figure 15 : Influence des différents milieux de culture sur la croissance mycélienne de l'isolat *Verticillium* sp.1

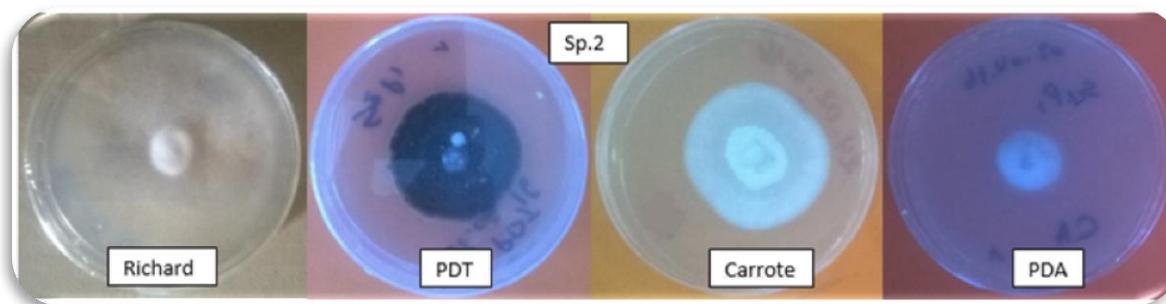


Figure 16 : Influence des différents milieux de culture sur la croissance mycélienne de l'isolat *Verticillium* sp.2

Les figures 15 et 16, montrent l'aspect macroscopique de *Verticillium* sp.1 et *Verticillium* sp.2. On remarque que l'aspect des colonies diffère d'un isolat à l'autre, en effet sur milieu Richards le mycélium est presque transparent, alors que sur milieu P.D.T, la colonie est recouverte de micro sclérotés ce qui lui confère une coloration noire. Sur le milieu P.D.A et celui à base de carotte la couleur du mycélium est blanche. Nous avons noté que l'aspect des colonies change en fonction du milieu et ce pour les deux isolats étudiés.

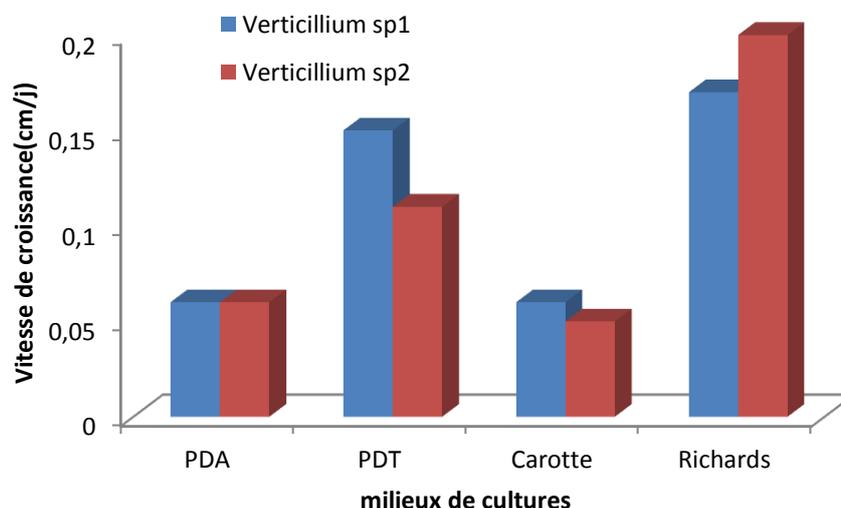


Figure 17 : la vitesse de croissance des deux isolats de *Verticillium* sp. cultivés sur différents milieux.

La figure 17, représente la vitesse de croissance des deux isolats cultivés sur les quatre milieux de culture différents. Les résultats, ont montré que le milieu Richards a permis la croissance la plus rapide avec 0.2 cm/j pour *Verticillium* sp.2 et 0.17 pour *Verticillium* sp.1. sur le milieu P.D.T la vitesse de croissance a diminué pour atteindre 0,15cm/j pour *Verticillium* sp.1 et 0,12cm/j pour *Verticillium* sp.2. À l'opposé, on retrouve les milieux P.D.A

et carotte ou la vitesse de croissance des deux isolats était plus lente, aux alentours de 0.06cm/j.

Les résultats de la sporulation sont représentés sur le tableau 10, ils révèlent que l'ensemble des milieux ont permis une sporulation plus ou moins abondante selon l'isolat.

Le *Verticillium* sp.1, est celui qui a le mieux sporulé. En effet, la production de spores était spectaculaire avec $183,1 \times 10^6$ spores/ml sur le milieu P.D.T, sur le milieu carotte, il a enregistré une sporulation conséquente avec $20,54 \times 10^6$ spores/ml. Sur le milieu Richards cet isolat a fourni $14,7 \times 10^6$ spores/ml.

Le *Verticillium* sp.2, a très peu sporulé sauf sur milieu Richards où l'on a dénombré $19,1 \times 10^6$ spores/ml.

Tableau 09 : Influence des différents milieux de culture sur la sporulation (spores. 10^6 /ml) des deux isolats de *Verticillium* sp.(spores / ml. 10^6).

Milieux de culture	PDA	PDT	Carotte	Richards
Isolats (cm/j)				
<i>Verticillium</i> sp.1	1.51	183.1	20.54	14.7
<i>Verticillium</i> sp.2	0.71	2.68	7.33	19.1

I-2- Influence de la température sur la croissance mycélienne et la sporulation de *Verticillium* sp.

Les résultats de l'effet de la température sur la croissance mycélienne *Verticillium* sp1 et *verticillium* sp.2 sont représentés sur les figures 18, 19. On remarque que les températures 22°C et 25°C ont mieux favorisé la croissance mycélienne, et que les températures 18°C et 20°C ont permis presque la même croissance.

D'après la figure, l'optimum de croissance mycélienne de *Verticillium* sp1 est enregistré à 25°C. 22° a également permis une bonne croissance mycélienne. Cette dernière a été nettement inférieure sous l'effet de 20°C et 18°C.

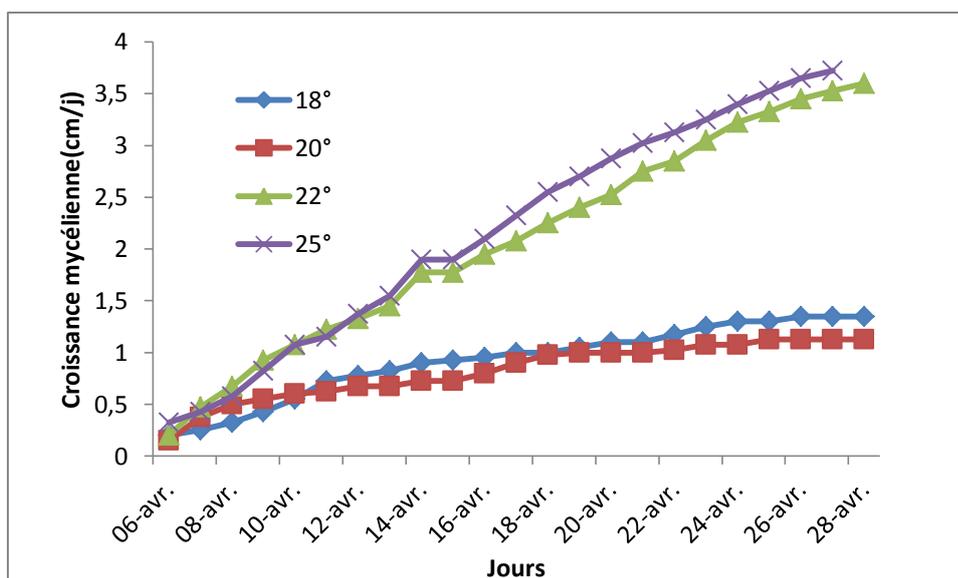


Figure 18 : Influence des températures sur la croissance mycélienne (cm/j) de *Verticillium* sp.1

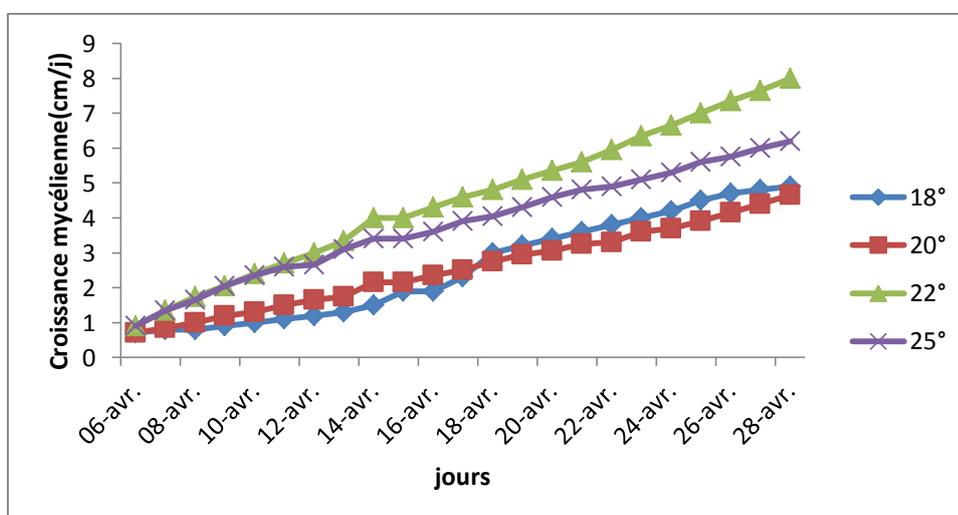


Figure 19 : Influence des températures sur la croissance mycélienne (cm/j) de *Verticillium* sp.2

La croissance de l'isolat *Verticillium* sp.2, représentée sur la figure 19, est nettement plus importante à 22°C. Il en ressort que c'est sa température optimale. Les températures 18°C et 20°C ont peu favorisé la croissance mycélienne, alors qu'à 25°C elle était intermédiaire.

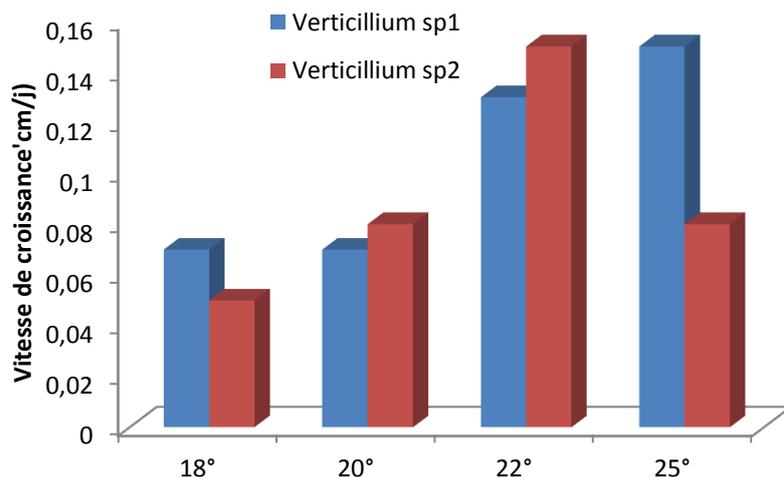


Figure 20 : la vitesse de croissance des deux isolats de *Verticillium sp.* incubés à différentes températures

Le calcul de la vitesse de croissance, représenté sur la figure 20, démontre que la croissance de *Verticillium sp1* est plus rapide à 25°C et *Verticillium sp2*, l'est à 22°C.

Si l'on compare la vitesse de croissance entre les deux isolats on remarque, que *Verticillium sp1* est nettement plus rapide, sauf à 18 et 20°C où *Verticillium sp.2* prend le dessus, mais d'une manière modeste.

II-2-2- Influence de quelques températures sur la sporulation de *Verticillium sp.*

Les résultats de la sporulation des isolats *Verticillium sp1* et *Verticillium sp2* sont représentés sur le tableau.

On remarque que la sporulation est influencée d'une manière remarquable par les étages de températures. Cette dernière suit la croissance mycélienne, avec un optimum de sporulation enregistré à 25°C, soit $183,1 \times 10^6$ spores/ml pour *Verticillium sp1* et $23,2 \times 10^6$ spores/ml enregistré à 22°C pour *Verticillium sp2*.

D'autre part on remarque que *Verticillium sp1* sporule mieux que *Verticillium sp2*, pour l'ensemble des températures testées.

Tableau 10 : Influence des températures sur la sporulation des deux isolats de *Verticillium* sp. ($\times 10^6$ spores / ml.).

Températures (°C)	18°	20°	22°	25°
<i>Verticillium</i> sp1	16.11	11.32	8.1	183.1
<i>Verticillium</i> sp2	10.2	3.74	23.2	2.68

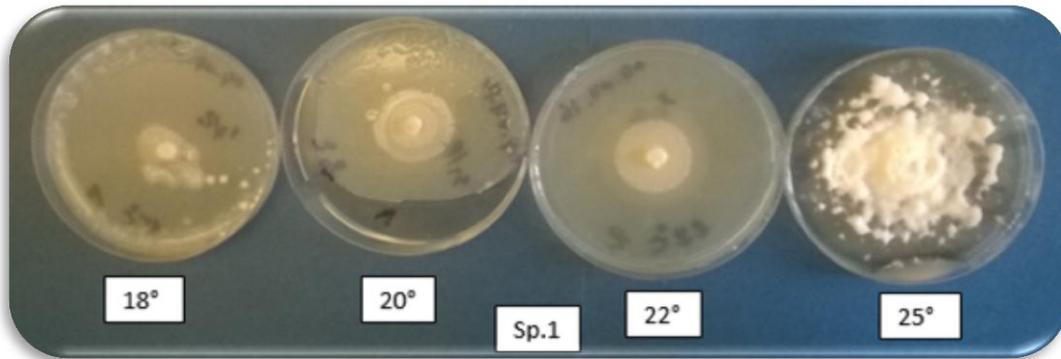


Figure 21 : Influence de la température sur la croissance mycélienne de l'isolat de *Verticillium* sp.1

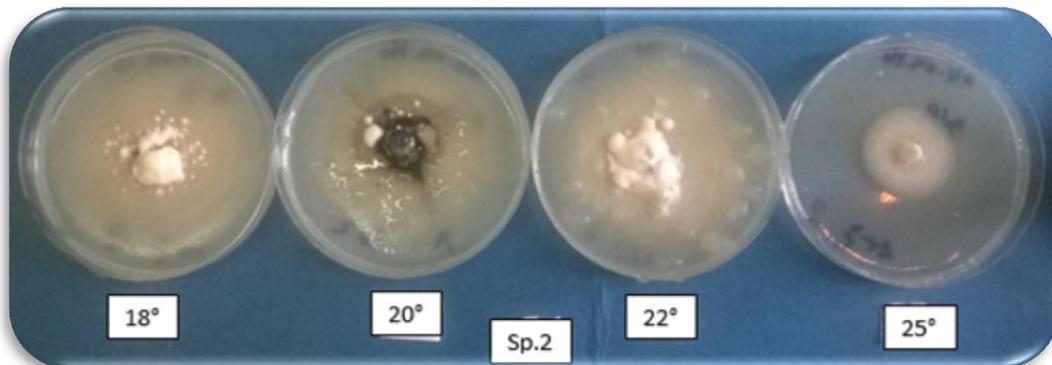


Figure 22 : Influence de la température sur la croissance mycélienne de l'isolat de *Verticillium* sp.2

II-2-3- Influence de l'humidité relative

Les résultats de l'effet de l'humidité relative sur la croissance mycélienne de *Verticillium* sp.1 et *Verticillium* sp.2, sont représentés sur les figures 23, 24. On remarque que la croissance mycélienne est nettement favorisée par l'humidité relative.

En effet, on constate qu'il existe une relation proportionnelle entre eux. On distingue nettement sur les figures 23, 24 que la croissance mycélienne est favorisée par une atmosphère saturée en humidité. Et que cette dernière est réduite avec la diminution du taux d'humidité pour s'annuler à 14%.

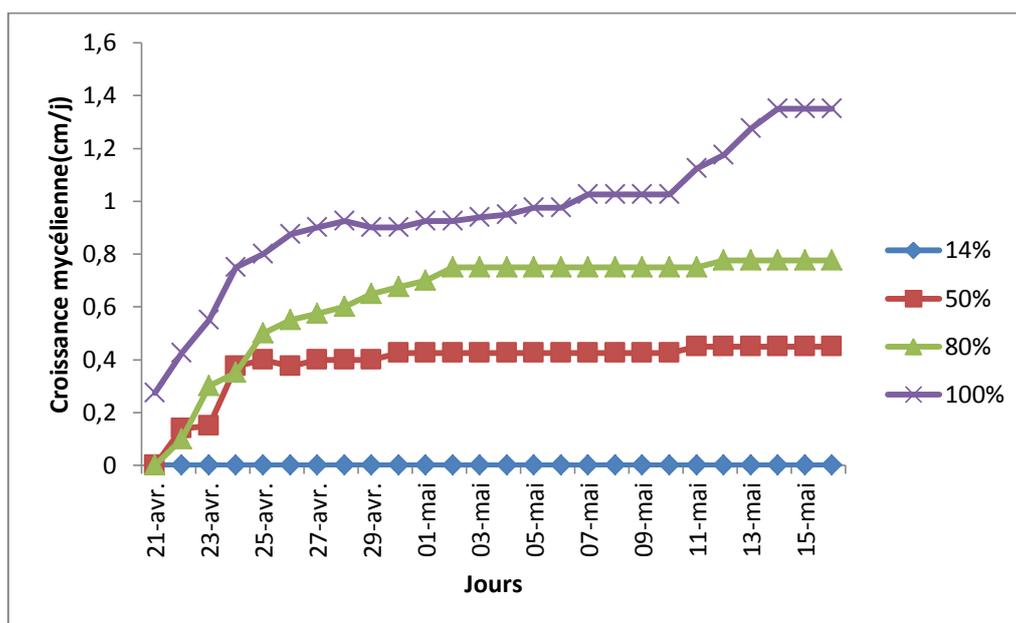


Figure 23 : Influence de l'humidité relative sur la croissance mycélienne de l'isolat *Verticillium* sp.1

D'après la figure 23, on remarque une nette différence entre la croissance mycélienne de *Verticillium* sp.1 à 100% et celle à 80%, surtout les derniers jours du test où l'on note des croissances respectifs de 1,4cm et 0,8 cm.

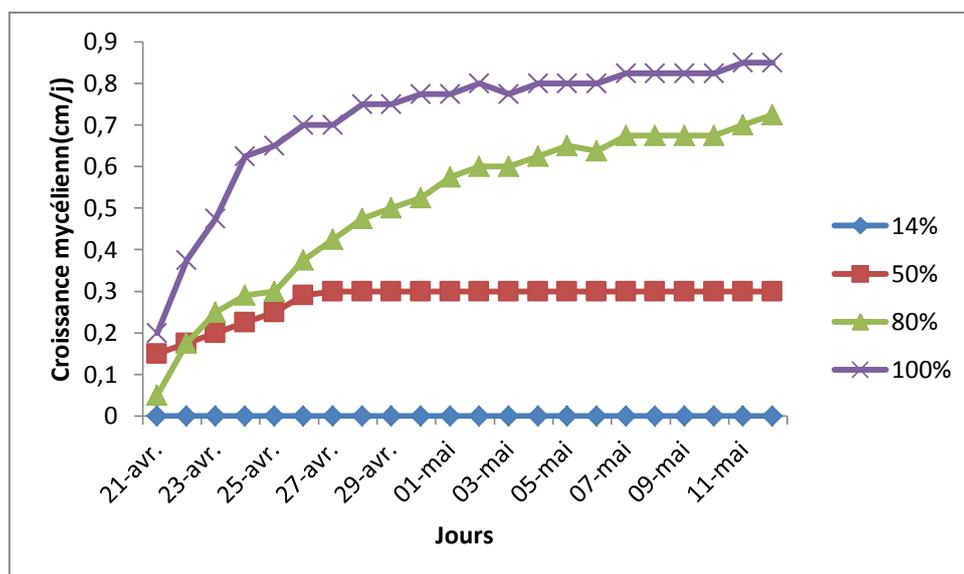


Figure 24 : Influence de l'humidité relative sur la croissance mycélienne de l'isolat *Verticillium sp.2*

Les résultats du test obtenus pour l'isolat *Verticillium sp.2*, sont similaires aux résultats précédents, et démarque le taux d'humidité de 100% des autres, quoique la différence entre la croissance à 100% et 80% n'a pas été aussi importante.

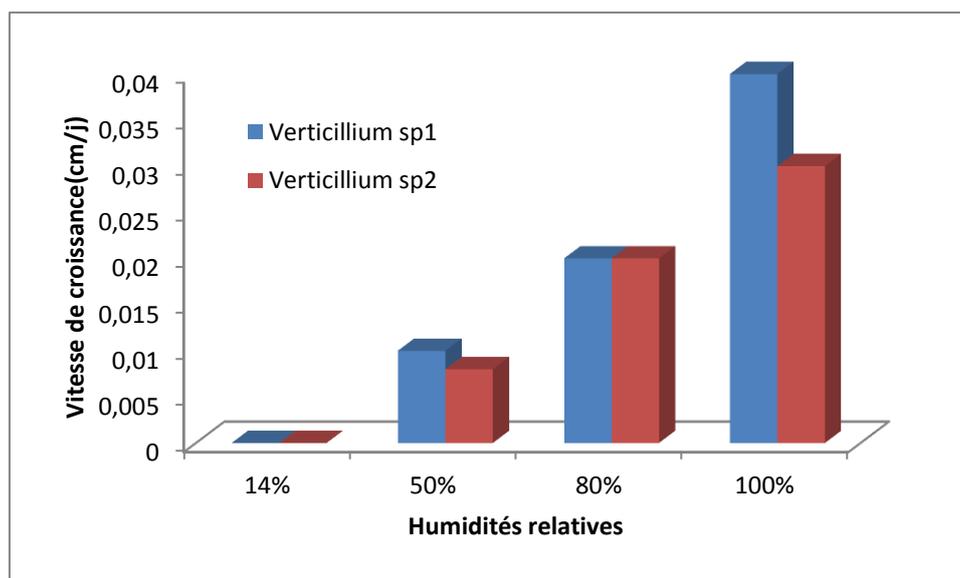


Figure 25 : Influence de l'humidité sur la vitesse de croissance (cm/j) des deux isolats de *Verticillium sp*:

Le calcul de la vitesse de croissance représenté sur la figure 25, montre clairement que l'humidité relative la plus favorable à la croissance mycélienne est 100% pour les deux isolats testés, suivi de 80%. La vitesse de croissance à 14% est nulle.

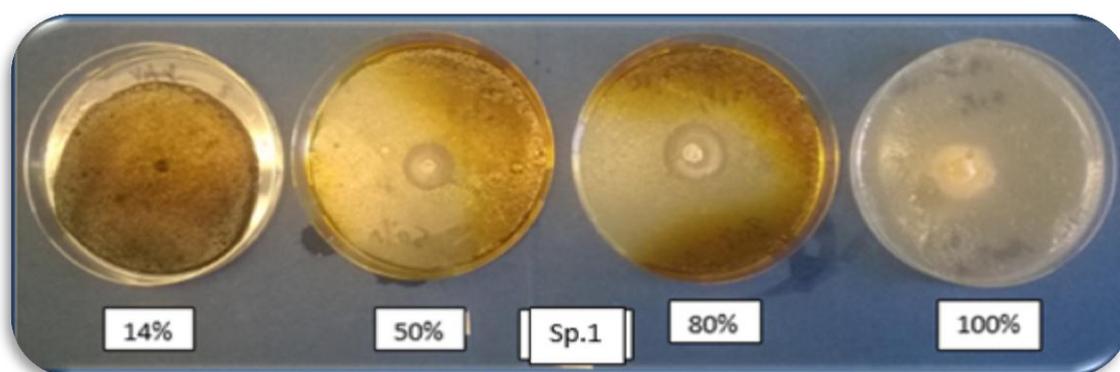


Figure 26 : Influence de l'humidité relative sur la croissance mycélienne (cm/j) de l'isolat *Verticillium* sp.1.

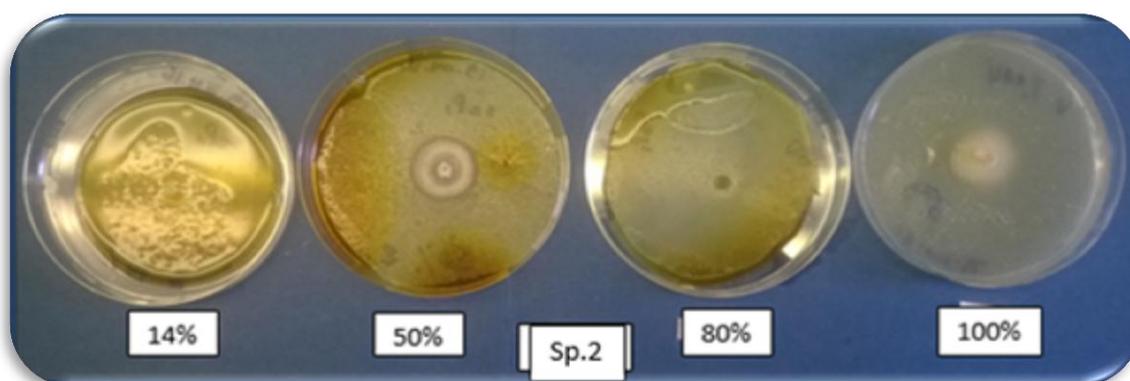


Figure 27 : Influence de l'humidité relative sur la croissance mycélienne (cm/j) de l'isolat *Verticillium* sp.2.

Tableau 11 : Influence de l'humidité sur la sporulation (spores/ml.10⁶) des deux isolats de *Verticillium* sp. (spores/ ml) :

	14%	50%	80%	100%
<i>Verticillium</i> sp.1	0,13	7,21	7,46	7,95
<i>Verticillium</i> sp.2	0,16	0,18	2,93	5,66

Le tableau 11, représente l'effet des taux d'humidité sur la sporulation des deux isolats de *Verticillium* sp. testés. Il fait ressortir que la sporulation est nettement supérieure à 100% d'humidité relative et diminue lorsque l'atmosphère devient moins humide. On remarque également que *Verticillium* sp.1 sporule mieux que *Verticillium* sp.2.

II-2-4- Influence du pH

Les résultats obtenus à la suite de ce test sont représenté sur les figure 28 et 29 des derniers montrent que nos isolats ont montré une croissance mycélienne importante dans la gamme de pH testé.

Ce résultat a été renforcé par l'analyse de variance qui n'a démontré aucune différence significative entre les croissances mycéliennes des deux isolats étudiés aux différents pH testés.

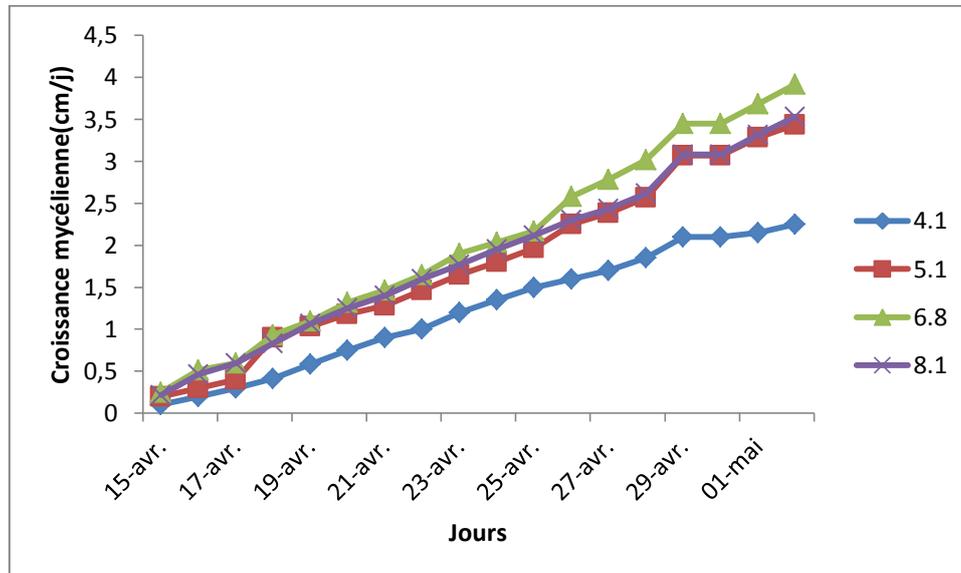


Figure 28 : Influence du pH sur la croissance mycélienne de l'isolat *Verticillium* sp.1

D'après la figure 28, on remarque une bonne croissance mycélienne de *Verticillium* sp.1 à tous les pH, sauf au pH acide de 4,1 où elle était légèrement moins importante.

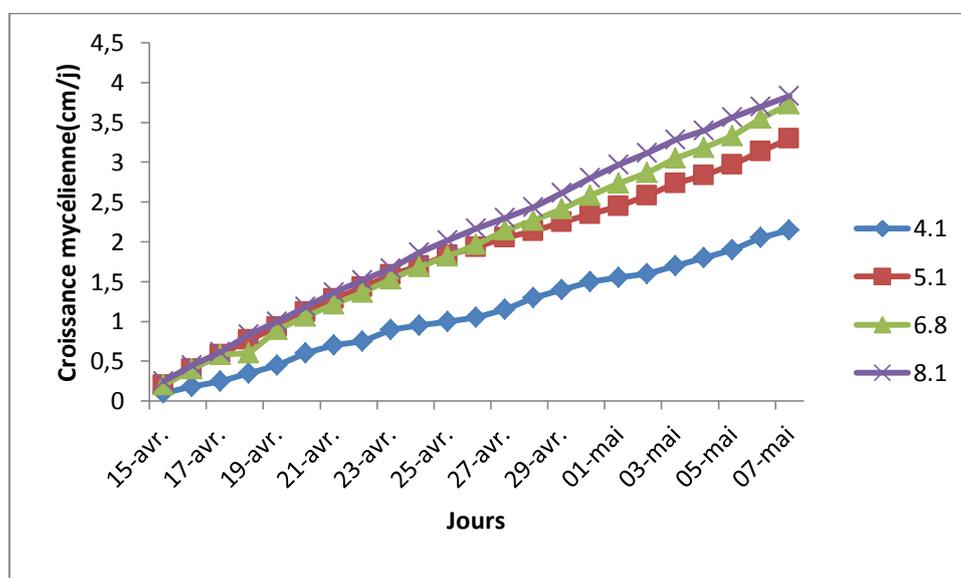


Figure 29 : Influence du pH sur la croissance mycélienne de l'isolat *Verticillium* sp.2

De même, pour *Verticillium* sp.2, la croissance est beaucoup plus grande au pH alcalin, mais reste comme même importante au pH acide (4,1),

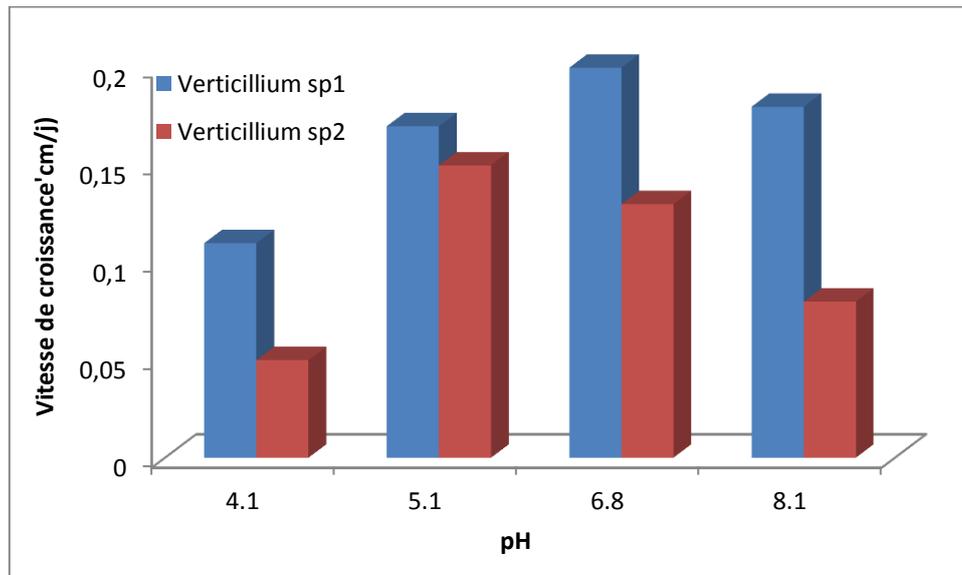


Figure 30 : Influence du pH sur la croissance mycélienne (cm/j) de l'isolat *Verticillium* sp.

Les vitesses de croissance représentée sur la figure 30, montrent qu'elles sont proches sous l'influence des différents pH.

On distingue par ailleurs que l'isolat *Verticillium* sp1, était le plus rapide, spécialement au pH 6,8. Alors que la vitesse de croissance *Verticillium* sp2, était plus importante au pH 5,1. Ce qui démontre que les deux isolats préfèrent les pH intermédiaires même si cette différence n'est pas significative.

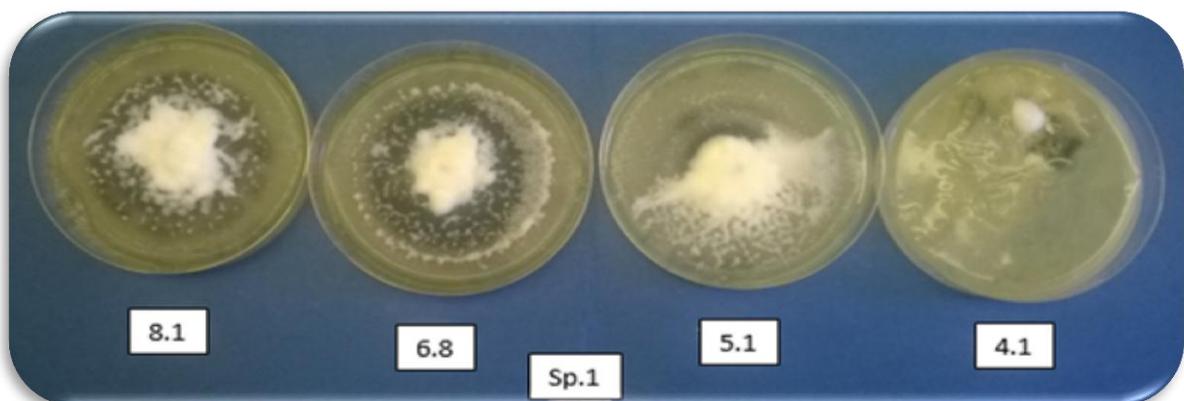


Figure 31 : Influence du pH sur la croissance mycélienne (cm/j) de l'isolat *Verticillium* sp.1.

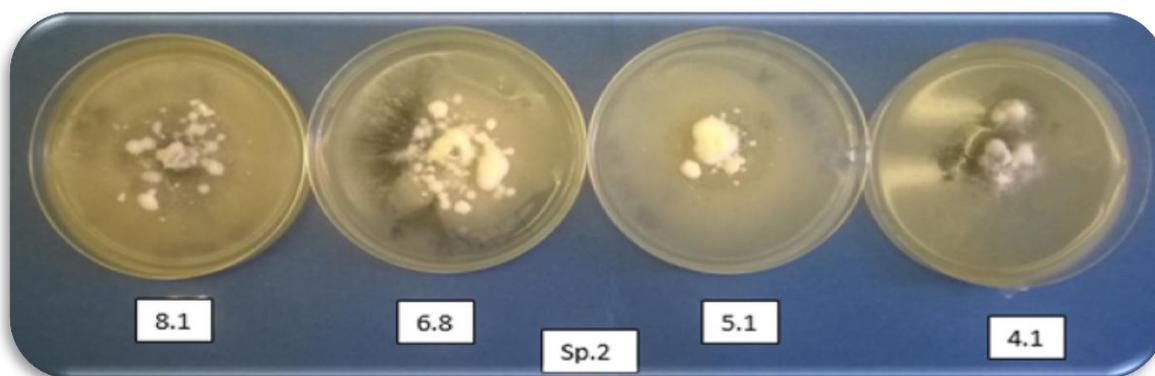


Figure 32 : influence de pH sur la croissance mycélienne (cm/j) de l'isolat *Verticillium* sp.2.

Les résultats de la sporulation sont représentés sur le tableau 12, ce dernier montre que les deux isolats ont sporulé d'une manière intense comparativement aux autres tests. En effet, nous avons noté la valeur la plus élevée, soit 513×10^6 spores / ml chez l'isolat *Verticillium* sp.1 au pH 4,1.

On remarque également que *Verticillium* sp.2 a moins sporulé que *Verticillium* sp.1., néanmoins sa sporulation reste très importante avec un optimum de 68,5 enregistré au pH 5,1

Tableau 12 : Influence du pH sur la sporulation (spores/ml. 10^6) des deux isolats de *Verticillium* sp.

pH	4.1	5.1	6.8	8.1
<i>Verticillium</i> sp.1	513.0	118.3	87.8	91.1
<i>Verticillium</i> sp.2	13.3	68.5	42	56.3

II-3- Discussion

L'étude de l'effet des facteurs abiotique sur le comportement *in vitro* d'un isolat permet de déterminer les conditions favorables pour sa croissance mycélienne et sa sporulation. Nous avons retenu quatre facteurs abiotiques : substrat de culture, température, humidité relative et la sporulation.

L'étude de la croissance mycélienne et la sporulation des deux isolats sur 4 substrats, deux synthétiques (P.D.A et Richards) et deux organiques (P.D.T et carotte), a montré que les deux isolats de *Verticillium* sp étudiés se développent mieux sur le milieu Richards suivi du milieu PDT, alors que les deux autres milieux étaient moins favorables. Ce qui nous laisse croire que les deux isolats préfèrent les milieux synthétiques. Les travaux de METOUI et

ZARROUK (2006) et ceux de MALIK (2008), ont énoncé que le milieu P.D.T était favorable à la croissance de *V. dahliae*.

Le développement variable des champignons sur les milieux organiques et synthétiques s'explique par le fait qu'ils métabolisent préférentiellement certains substrats à d'autres impliquant probablement leur capital enzymatique (TLEMSANI, 2010).

Les milieux synthétique sont favorables à la croissance des champignons filamenteux (ATTRASSI *et al.*, 2005), car ce sont des milieux nutritifs conçu spécialement pour leur culture (RAMUALDE, 1992 ; MALIK, 2008 ; CSÖNDES *et al.*, 2012). Ces milieux renferment exclusivement les éléments essentiels à leur croissance.

L'étude de l'effet des différentes températures sur la croissance mycélienne et la sporulation, départage les deux isolats étudiés. En effet, l'optimum de croissance mycélienne et la sporulation de *Verticillium* sp.1 est enregistré à 25°C alors que celui de *Verticillium* sp.2 est consigné à 22°C.

Nos résultats s'accordent avec BOISSON et LAHLOU (1983); JABNOUN-KHIAREDDINE, (2006) ; METOUI et ZARROUK (2006) qui dévoilent que les températures comprises entre 21 et 28°C sont favorables à la croissance de *Verticillium* sp.. De même MALIK (2008), montre que la température optimale de croissance ce champignon est 25°C. Alors que REGRAGUI (2005) et PEGG et BRADY (2002) la situe à 27°C.

Par ailleurs, d'autres auteurs ont étudiés la relation entre le facteur thermique et la pathologie de *Verticillium* sp. sur oliviers et ont classés deux pathotypes de *Verticillium* sp. en fonction de leur optima thermique: le pathotype non défoliant dont la croissance mycélienne maximale est comprise entre 21°C et 24°C et le pathotype défoliant dont la croissance est comprise entre 24°C et 27°C (RAMUALDE, 1992; BEJARANO-ALCAZAR *et al.*, 1996). En se référant à ces travaux et d'après les résultats que nous avons obtenus on peut prétendre que *Verticillium* sp.1 est un pathotype défoliant et *Verticillium* sp2, est un pathotype non défoliant.

Les résultats du test de l'effet de l'humidité relative sur les isolats de *Verticillium* sp étudiés, montrent que la croissance mycélienne et la sporulation sont fortement influencées par l'humidité. Elles sont maximales lorsque l'humidité s'approche de la saturation, et nulles dans des conditions de sécheresse. Nos résultats sont en concordance avec ceux de COCHRANE (1958), BAGHDADI (1992).

Lors de l'étude de l'effet du pH sur la croissance mycélienne et sporulation de *Verticillium* sp.1 et *Verticillium* sp.2. Nous avons choisi de tester des pH acides, neutres et alcalins. Les résultats obtenus attestent que, ce facteur n'a pas d'effet significatif sur le

développement des deux isolats étudiés. Le pH le plus favorable à la croissance de *Verticillium* sp.1, est 6,1 alors que celui de *Verticillium* sp.2, est le pH 5,1.

Les travaux de PEGG et BRADY (2002) et MALIK (2008) ont montrés que le pH optimal de *Verticillium* sp. sur milieu P.D.T se situe entre 6.0 et 8.0, ou selon SEDRA (2002) a des pH inférieurs à 6.0.

II-4- Evaluation de l'activité antifongique de l'extrait méthanoïque de *Salvia officinalis* sur *Verticillium* sp. agent de verticilliose.

II-4-1- Evaluation de l'efficacité antifongique "in vitro" de l'extrait polyphénolique de la sauge sur la croissance mycélienne de *Verticillium* sp.

Les résultats du test antifongique des différentes concentrations de l'extrait polyphénolique réalisé « in vitro », montre une efficacité remarquable vis-à-vis des isolats, *Verticillium* sp1 et *Verticillium* sp2. L'analyse de variance démontre un effet significatif entre les différents traitements.

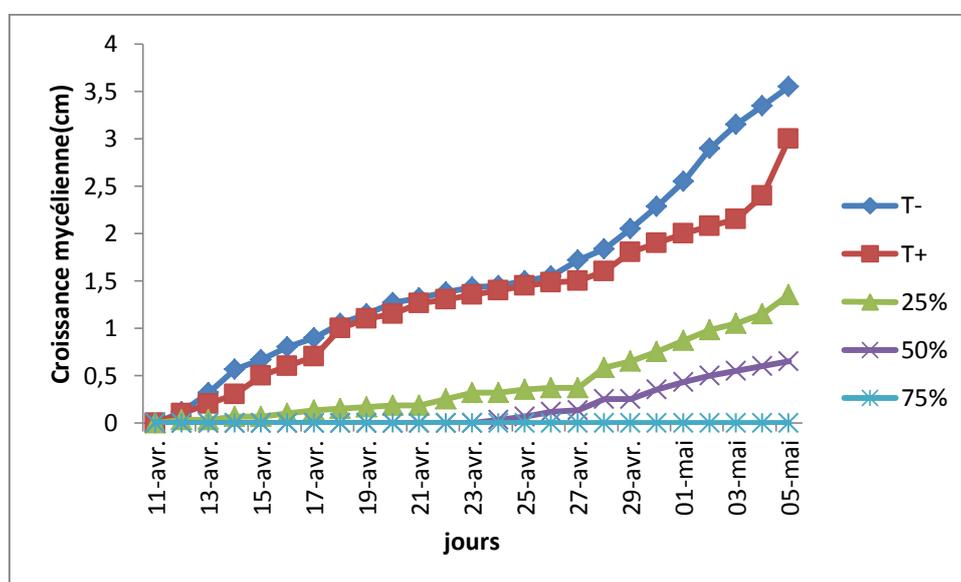


Figure 33 : Effet de l'extrait de la sauge sur la croissance mycélienne de *Verticillium* sp.1

Les résultats du test de l'effet de l'extrait sur la croissance mycélienne de *Verticillium* sp.1 et *Verticillium* sp.2 sont représentés sur les figures 33 et 34 .

Ces derniers démontrent la capacité de l'extrait méthanoïque des feuilles de la sauge à inhiber la croissance du pathogène. En effet, l'extrait polyphénolique des feuilles de sauge exerce une réduction importante de la croissance qui est proportionnelle avec la concentration. On note également que la dose de 75% a réussi à inhiber complètement la croissance mycélienne, elle est de ce fait la CMI.

A l'opposé, les témoins, ont assuré une croissance mycélienne importante. Néanmoins une légère réduction de la croissance a été remarquée au niveau du témoin positif, probablement due à l'action de l'acétone.

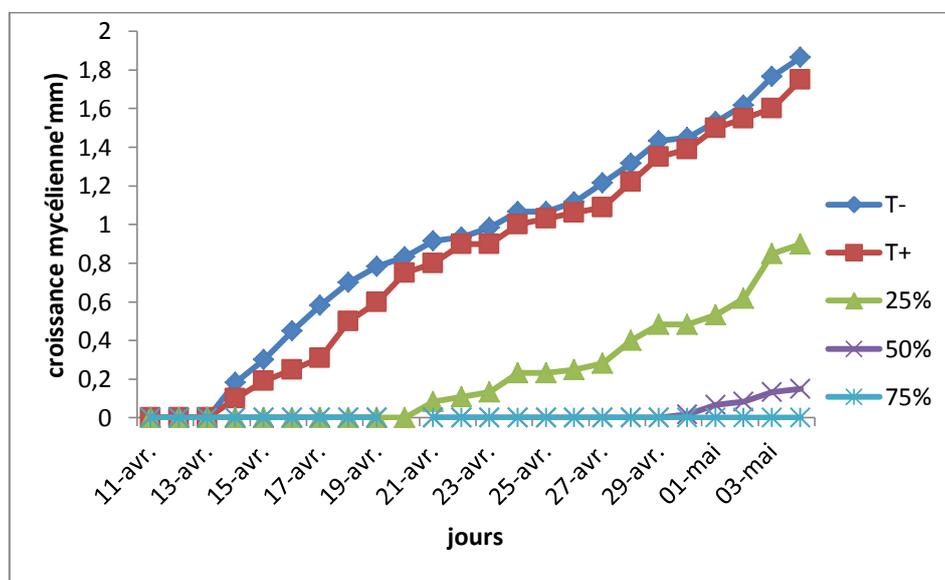


Figure 34 : Effet de l'extrait de la sauge sur la croissance mycélienne de *Verticillium sp.2*

La figure ci-dessus, représente l'effet des différentes doses de l'extrait méthanoïque des feuilles de sauge sur *Verticillium sp.2*, et met en exergue l'efficacité des trois concentrations, 75%, 50% et 25% à inhiber sa croissance mycélienne. De même, aucun développement mycélien n'a été enregistré à la concentration de 75%, ce qui fait d'elle la CMI à l'instar de *Verticillium sp.1*.

La concentration 50% de l'extrait méthanoïque a totalement réduit la croissance jusqu'au 20^{ème} jour ou l'on remarque une très légère croissance. La croissance mycélienne des témoins est significativement supérieure aux différents traitements.

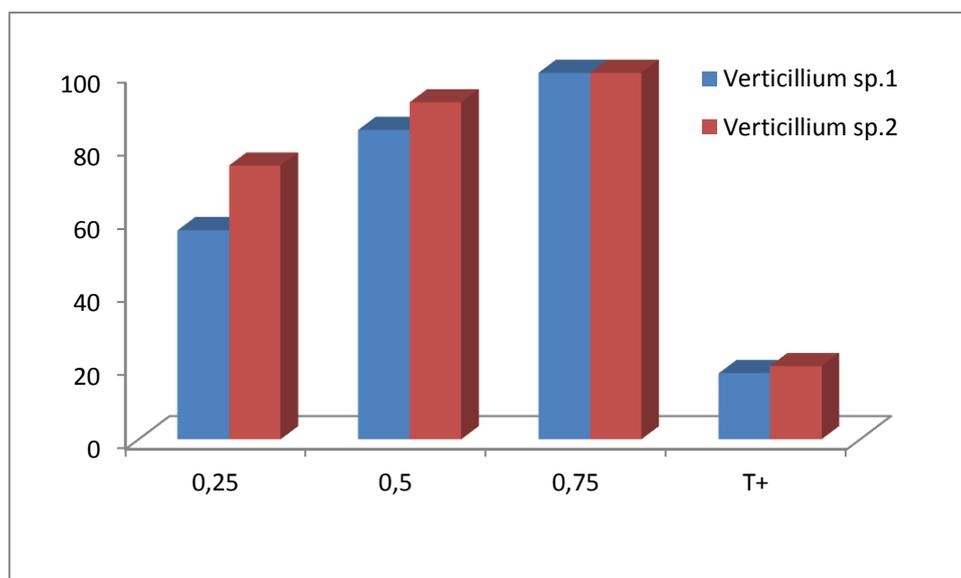


Figure 35 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Verticillium* sp.1 et *Verticillium* sp.2 sous l'effet des différentes concentrations de l'extrait polyphénolique de *Salvia officinalis*

Les taux d'inhibitions de l'extrait méthanoïque des feuilles de sauge sont représentés sur la figure 35, et démontrent clairement que cet extrait est très efficace à contrôler la croissance mycélienne de *verticillium* sp. On remarque également que les deux isolats se sont comportés de la même manière avec une légère sensibilité de l'isolat *Verticillium* sp.1.

A la lumière des résultats obtenus, on remarque une corrélation entre les doses de l'extrait et le taux d'inhibition. En effet, plus la dose de l'extrait est élevée, plus le diamètre de la colonie et sa vitesse de croissance sont faibles.

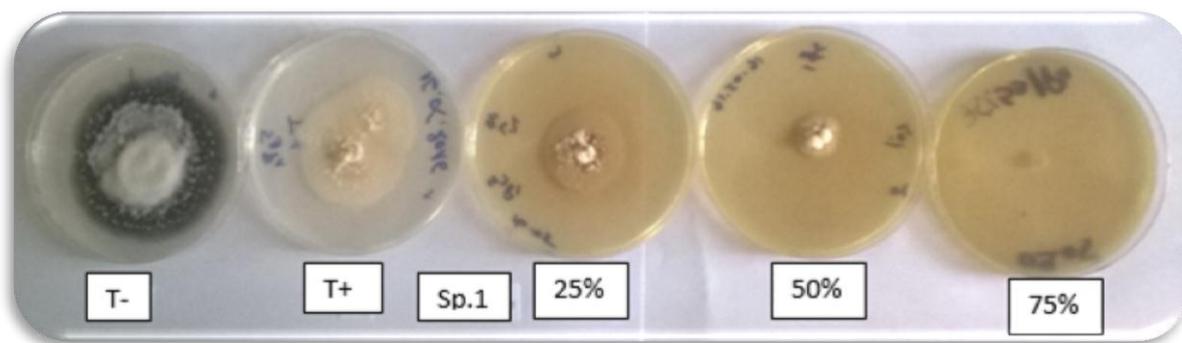


Figure 36 : Effet de l'extrait polyphénolique de *Salvia officinalis* sur la croissance mycélienne de sp.1.

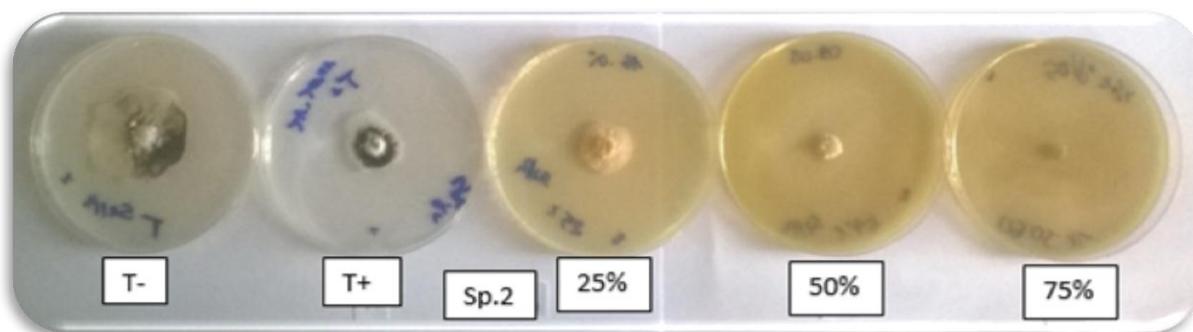


Figure 37 : Effet de l'extrait polyphénolique de *Salvia officinalis* sur la croissance mycélienne de sp.2.

II-4-2- Effet de l'extrait polyphénolique de la sauge sur la sporulation de *Verticillium* sp1 et *Verticillium* sp2

La figures 38, illustrent l'effet des différentes doses de l'extrait polyphénolique sur la sporulation des deux isolats. Il en ressort que comparativement au témoin, les concentrations de 25%, 50% ont présenté un pouvoir inhibiteur très important alors que la dose de 75% a provoqué une inhibition totale. Nous avons remarqué que *Verticillium* sp2 est plus sensible vis-à-vis de l'extrait méthanoïque testé.

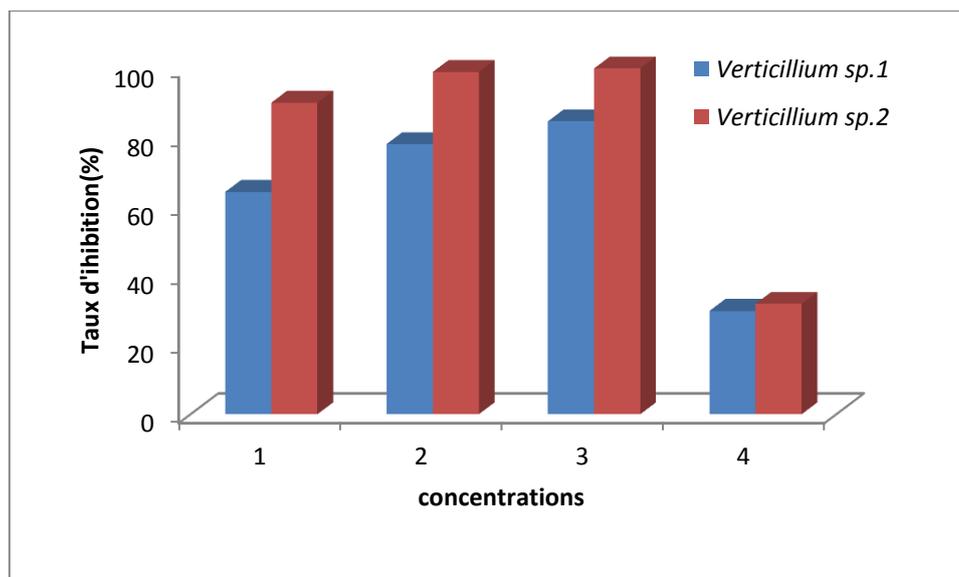


Figure 38 : Taux d'inhibition de la sporulation de *Verticillium* sp.1 et *Verticillium* sp.2 sous l'effet des différentes concentrations de l'extrait polyphénolique de *Salvia officinalis*

II-5- Evaluation de l'efficacité antifongique "in vivo" de l'extrait polyphénolique de la sauge sur l'agrissivité de *Verticillium* sp.

Les symptômes visibles induits par les deux isolats sur les plants de tomate sont une chlorose, nécrose ou altération de la tige, une sénescence précoce des feuilles, un flétrissement et même une défoliation.

Nous avons également remarqué des chloroses inhabituels de l'attaque de *Verticillium* sp. spécialement sur les feuilles traités à l'extrait et au niveau du témoin acétone. Ce qui laisse croire qu'il s'agit d'une phytotoxicité, probablement due à l'acétone utilisé pour diluer l'extrait.

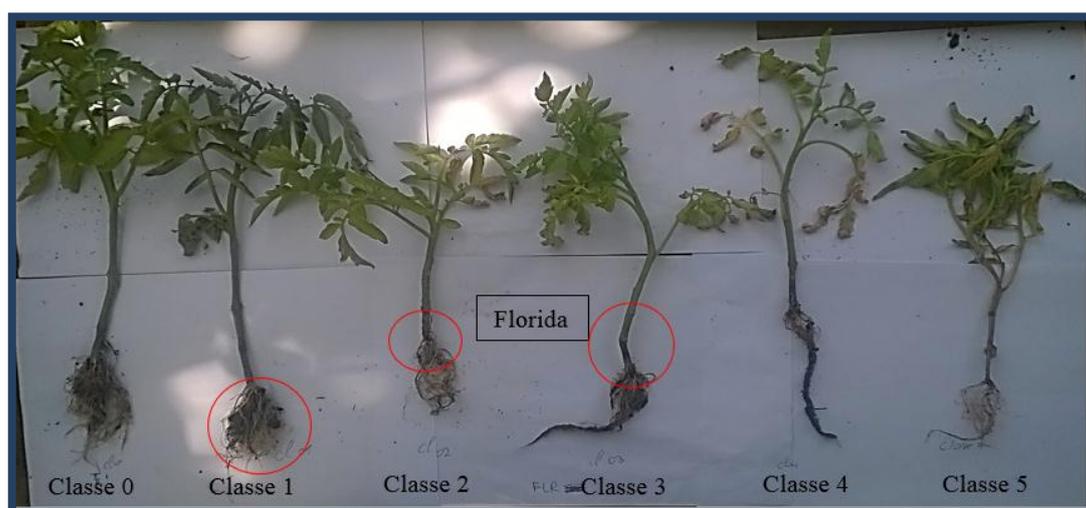


Figure 39 : Degré d'attaque des deux isolats sur des plantules de tomate variété Florida traités à l'extrait de sauge.

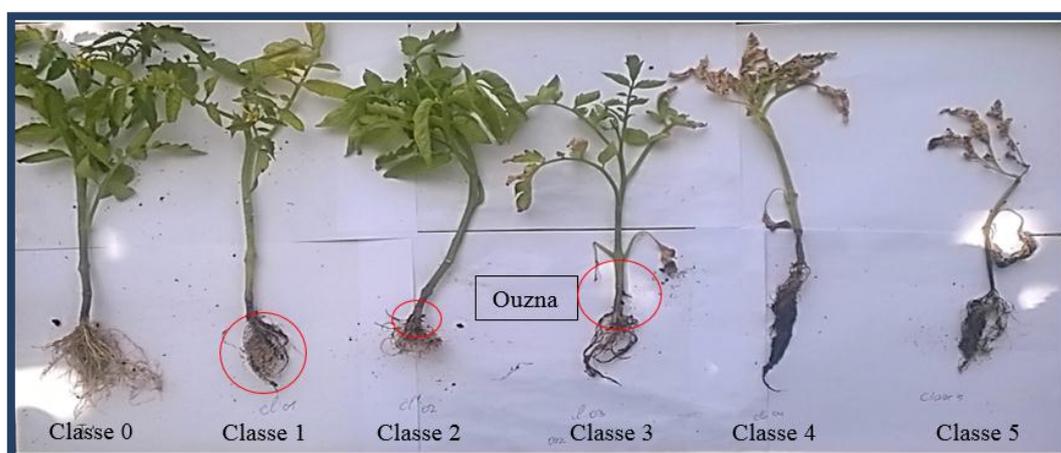


Figure 40 : Degré d'attaque des deux isolats sur des plantules de tomate variété Ouzna traités à l'extrait de sauge.

Les figures et , illustrent l'échelle de notation retenue pour le test, qui s'est basé sur l'apparition d'un des symptômes suscités, en partant de la base de la tige et en allant vers le haut.

Le tableau 13, représente récapitule les indices de maladies des différents traitements

Tableau 13 : Degré d'attaque des deux isolats sur des plantules de tomate traités à l'extrait de sauge.

Isolats	Traitement appliqué	Indices de maladie			
		Florida	Signification	Ouzna	Signification
<i>Verticillium</i> sp1	Eau	0	Résistant	0	Résistant
	Extrait	0	Résistant	0	Résistant
	Acétone	1	Résistant	1,6	Résistant
	Inoculation de 4 ml de <i>Verticillium</i> sp.1	1,5	Résistant	2,66	Résistant
	Inoculation de 4 ml de <i>Verticillium</i> sp.1+ extrait	3	moyennement résistant	3,4	moyennement résistant
<i>Verticillium</i> sp2	Eau	0	Résistant	0	Résistant
	Extrait	0	Résistant	0	Résistant
	Acétone	1	Résistant	1,6	Résistant
	Inoculation de 4 ml de <i>Verticillium</i> sp2	3,33	moyennement résistant	3,33	moyennement résistant
	Inoculation de 4 ml de <i>Verticillium</i> sp2+ extrait	2	Résistant	4,83	Sensible

D'après les résultats obtenus on remarque que les indices de maladie diffèrent d'un traitement à l'autre. L'ensemble des traitements ont présenté des indices inférieurs à 4, donc classés comme résistants et moyennement résistants. Seul le lot inoculé par *Verticillium* sp.2 et traité avec l'extrait des feuilles de sauge qui a été classé comme sensible puisqu'il a enregistré un indice de 4,83 très proche de 5.

L'essai a été mis en place pour évaluer s'il y a lieu un effet préventif de l'extrait sur l'apparition des symptômes, ce qui se traduirait par des indices de maladie moins importants dans les lots inoculé par le pathogène et traités par l'extrait des feuilles de sauge comparativement à ceux inoculé et non traités.

A l'encontre de ce qu'on attendait, les lots traités, ont présenté des indices de maladie moins importants que ceux des lots non traités. Non seulement l'extrait méthanoïque des feuilles de sauge n'a présenté aucun effet préventif, mais paraît amplifier l'agressivité des isolats. Il semble potentialiser l'attaque du pathogène.

II-6- Discussion

L'extrait des feuilles de *Salvia officinalis* a manifesté "*in vitro*", une activité antifongique très probante; cette dernière s'exprime déjà avec la concentration de 25%. Avec 75% l'inhibition de la croissance mycélienne est totale.

L'étude de la croissance mycélienne des deux isolats fongiques testés (*Verticillium* sp.1 et *Verticillium* sp.2), en présence de l'extrait polyphénolique de *Salvia officinalis*, montre une diminution de la croissance mycélienne synchronisée avec l'augmentation de la concentration de l'extrait.

De même sous l'effet de l'extrait on remarque que plus la concentration augmente, l'inhibition est importante par rapport aux témoins. Ces derniers montrent nettement que les trois paramètres étudiés (la croissance mycélienne, taux d'inhibition et la sporulation) sont fortement influencées par l'incorporation d'un extrait riche en substances bioactive dans le milieu de culture.

Les résultats obtenus confirment ceux présenté par GRAINGE et AHMED (1988), qui ont montrés que les lamiacées possèdent une activité antibactérienne et antifongique grâce à la multitude de composés phénoliques qu'ils contiennent, et d'après CELIMENE, 1999; COWAN,1999, la toxicité des composés phénoliques envers les champignons est basée sur l'inactivation des enzymes fongiques.

Donc d'une manière générale, le degré d'activité antifongique est proportionnel à la concentration de l'extrait. Les composés chimiques qui présente la plus grande efficacité et à plus large spectre sont les phénols (**FRANCHOMME, PENOEL *et al.*, 1990, DORMAN et DEANS, 2000**).

Contre les champignons, les phénols provoquent plusieurs dégâts tels que des perturbations morphologiques des hyphes mycéliens, la rupture de la membrane plasmique et l'altération de la structure des mitochondries (**ARRAS *et al.*, 2001 ; DE BILLERBECK *et al.*, 2001**).

« *In vivo* », les traitements appliqués sur plantules ont montré, un effet contraire à celui escompté, au lieu de diminué l'attaque fongique, ce dernier a augmenté son incidence.

○ A

Alfano G., Lustrato G., Lima G., Vitullo D., Ranalli G., 2011. Characterization of composted olive mill wastes to predict potential plant disease suppressiveness. *Boil, Control.*, 58: 199-207.

Amouretti M.C. 2000. Le livre de l'olivier. Ed. EDISUD. Aix-en-Provence, France, 107pp. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 46 : 4869–4873.

Arfaoui, A. El Hadrami, A. Mabrouk, Y. Sifi, B. Boudabous, A. El Hadrami, I. Daayf, F. Cherif, M., 2007. Treatment of chickpea with Rhizobium isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum f. sp.ciceris*. *Plant physiology and Biochemistry*, 45: 470-479.

Argenson C. 2008. La culture de l'olivier dans le monde, ses production, les tendances. *Le Nouvel Olivier*. 61: 8-11.

ARRAS et al., 2001. Improving the Safety of Fresh Fruit and Vegetables (Livre).

Arslan M., Dervis S. 2010. Antifungal activity of essential oils against three vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae*. *World J. microbial, Biotechnol.*, 26: 1813-1821.

Assawah M.W., Ayat M., 1985. On certain diseases of olive trees at Oran area. Première journées Scientifiques de la société Algérienne de Microbiologie . Avril, Institut Pasteur, Alger, Algérie, 1-9.

Attrassi K ; Selmaoui K ; Ouazzani Touhami A ; Badoc A ; Douira A. 2005. Biologie et physiologie des principaux agents fongiques de la pourriture des pommes en conservation et lutte chimique par l'azoxystrobine *Bull. Soc.Pharm. Bordeaux.*, 144 : 47-62.

○ B

B.P. 2007. Extraction of phenolic and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*)

BARNETT H.L; Barry HUNTER B. 1972. Illustrated genera of imperfecti fungi. Third Edition. Burgess publishing company: 239 p.

Beddiar A., Mekahlia M.N., Meddad-Hamza A., 2008. Réponse de l'oleastre (*Olea oleaster*) (Hoofg. et sorgho (*Sorghum vulgare L*) à l'inoculation par quelques morphotypes de genre *Glaucium* extraits de sols Algérien. Journées Francophones Mycorhizes. Plante Microbe Environnement, 4-5 septembre, Dijon, France, pp. 29.

- Bejarano-Alcazar J., Blanco-Lopez M.A., Melero-Vara J.M., Jiménez-Diaz R.M. 1996.** Etiology, importance, and Plant Soil distribution of *Verticillium* wilt of cotton in southern Spain. *Plant Dis* 80: 1233-1238.
- Belaj., Mounoz-Diez C., Baldoni L., Satovic Z., Barranco D., 2010.** Genetic diversity and relationships of wild and cultivated olives at regional level in Spain. *Sci. Hortic.*, 124: 323-330p.
- Bellahcene M., Fortas Z., Fernandez D., Nicole M., 2005b.** Vegetative compatibility of *Verticillium dahlia* isolated from olive trees (*Olea europea L.*) in Algeria. *Afric. J. Biotechn.* 4 (9): 963-967.
- Bellahcene M., 2004.** La verticilliose de l'olivier : étude épidémiologique et diversité génétique de *Verticillium dahliae* Kleb., Agent de la verticilliose. Thèse Doct. D'Etat. Univ. Oran (Algérie) 144pp.
- Bellahcene M., Assigbetsé K., Fortas Z., Geiger J.P., Nicole M., Fernandez D., 2005a.** Genetic diversity of *Verticillium dahliae* isolates from olive trees in Algeria. *Phytopathol. Mediterr.*, 44: 566- 274.
- 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, pp.41-43.
- Ben Sid A., Chaouch Kouane H. 2010.** Etude de la variabilité de l'olivier (*Olea europae L.*) à Ain Zaatout (Wilaya de Biskra). Séminaire International en Biologie végétale et Ecologie le 22-25 novembre 2010. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Montouri Constantine, (Algérie). 77p.
- Benchabane M. 1990.** Observation des cas de verticilliose de l'olivier à cap Djinet et Sidi-Aich. Rapport de mission. ITAF, Algérie. P5.
- Berlanger, I., Powelson M.L. 2000.** Verticillium wilt. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-PHI-I-2000-0801-01.
- Besnard G. Breton C., Baradat P., khadari B., Bervillé A. 2001.** Cultivars identification in the olive (*Olea europaea L.*) based on RAPDS. *J. Amer. Hort. Sci.*, 126: 668-675.
- Béye I. ; Lafay J-F., 1985,** Etude de critères de sélection pour une résistance générale à la verticilliose chez la tomate. *Agronomie*, 5 (4), 305-311.
- BOISSON C ; LAHLOU H. 1983.** Etude de polymorphisme intraclonal chez *Verticillium albo-atrum*, forme à microsclérote. I. La morphogénèse des thalles à partir des microconidies et ces variations. *Can. J. Bot.*, 58 : 2407-2419.
- Boukenadel F. 2001.** Contribution à l'étude de *Verticillium dahliae* Kleb, agent de la Verticilliose de l'olivier. Mém. Magister, Univ. Tlemcen (Algérie), 103p.

Bounoua M.D. 2008. Essais d'utilisation des *Pseudomonas* spp, et *Bacillus* spp. Dans le biocontrôle de *Fusarium oxysporum f sp. lycopersici* sur tomate et *Verticillium dahliae* sur l'olivier. Mém. Magister, Univ. Oran (Algérie), 90p.

Breton C., Besnard G., Bervillé A.A., 2006b. Using multiple types of molecular markers to understand olive phylogeography. In: Zeder M.A., Decker-Walters D., Bradley D., Smith B. (Eds). Documenting Domestication: new genetic and archaeological paradigms.: University of California Press, Berkeley. 143-152.

Breton C., Médail F., Pinatel C., Berville A., 2006a. De l'olivier à l'oléastre: Origine et domestication de l'*Olea europaea* L. Dans le Bassin méditerranéen. Cahiers agricultures vol. 15, n°4: pp. 329-335.

Breton C., Pinatel C., Médail F., Bervillé A., 2009. Origine géographique des variétés de l'olivier retracées à partir d'analyses génétiques. Etudes héraultaises, 7-12.

Brewer D. 1960. Studies in *Asochyta pisi*. Canadian journal de la végétale philosophie mathématique. Classique Hachette.

Brieskorn C.H., Biechele W. 1971. The flavones from *Salvia officinalis* L. Archiv der Pharmazie., **304** : 557–561.

Bruneton J .2009. Pharmacognosie et Phytochimie. Plantes médicinales, Tec et Doc : 278-279.

Bubici G., Cirulli M., 2011. Verticillium wilt of olives. In Schena L, Agosteo GE, Cacciola SO (eds) Olive diseases and disorders. Research Signpost, Kerala, (India), ISBN: 1-14.

o C

Caballero J.M., Del Rio C. 2008. The olive world germplasm bank of Spain. Acta. Hortic., 791: 31-38.

Carrion Y., Ntinou M., Badal E. 2010. *Olea europae* L. in the North Mediterranean Basin during the Pleniglacial and the Early-Middle Holocene. Quaternary Science Reviews, 29: 952-968.

Carter J.C. 1975. Disases of mid west trees Special Publication 35, University of Illinois at Urbana-Champaign College of Agriculture in cooperation with Illinois Natural History Survey.168p.

Celimene C.C., Micales J.A., Ferge L., Young R.A. 1999. Efficacy of pinosylvins against white-rot and brown-rot fungi. - Holzforschung, 53(5), 491-497.

Chaouia A. 2003. Evaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la concervation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour

l'agriculture. Cas des plantations arboricoles. Projet ALG/97/G31 PNUD, Alger, 22-23/01/2003, 60p.

Chaux C. 1995. Méthodes de recherches adoptées en matière de biologie florale de l'olivier-fruits et primeurs de l'Afrique du nord, 25 : 202-207.

Chawick, 1958: *The decipherment of linear B*, Cambridge England New York, Cambridge University Press, 1990, 2^e éd , traduit en français : *Le Déchiffrement du Linéaire B*, Paris, Gallimard, 1983.

Chawla S., Woodward JE., Wheeler T.A, 2012. Influence of *Verticillium dahliae* Infested Peanut Residue on Wilt Development in Subsequent Cotton. International Journal of Agronomy, Volume 2012, 212075, 5 pages.

Chromatography A., **1027** : 121-126.

Cirulli, M., Montemurro,G. 1976. A comparaison of pathogenic isolates of *verticillium dahlia* and sources of resistance in olive. Agr. Conspeshis scientificus, 39: 469-476.

Civantos L. 1999. Contrôle des parasites et des maladies de l'olivier. COI (Ed.), Madrid, Espagne, pp. 111-144.

Civantos L. 2008. La olivicultura en el mundo y en Espana. In : Brranco D, Fernandez-Escobar R, Rallo L (eds) El cultivo del olivo, 6th edn. Junta de Andalucia and Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 17-35.

Cordeiro A.I., Sanchez-Sevilla J.F., Alvarez-Tinaut M.C., Gomez-Jimenez M.C. 2008. Genetic diversity assessment in Portugal accessions of *Olea europaea* by RAPD markers. *Biologia Plantarum*, 52 (4): 642-647.

Cowan M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. - *Clin. Microbiol. Rev.*, 12(4), 564-582.

CSÖNDES I; Cseh A; Taller G; Poczai P. 2012. Genetic diversity and effect of temperature and pH of the growth of *Macrophomina phaseolina* isolates from sunflower fields in Hungary. *Mol Biol Rep*, 39: 3259-3269.

cultivated in south brazil. *Food chemistry.*, **100** : 603-608.

Cuvelier M.E., Richard H., et Berset C. 1996. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society.*, **73** : 645-652.

○ D

Dangles O; Stoeckel C; Wigand M.C; Brouillard R. 1992. Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. *Tetrahedron Lett*, 33: 5227-30.

DE BILLERBECK et al., 2001. The Year in Evolutionary Biology 2009 Par Carl D. Schlichting, Timothy A. Mousseau.

Dervis S., Erten L., soylu S., Tok F.M., Kurt S., Yildiz M. 2007. Vegetative compatibility groups in *Verticillium dahliae* isolates from olive in Western Turkey. Eur. J. Plant. Pathol., 119: 437-447.

Di Rita F., Magri D. 2009. Holocene drought, deforestation and evergreen vegetation development in the central Mediterranean: a 5500 year record from Lago Alimini Piccolo, Apulia, southeast Italy. The Holocene 19 (2): 295-306.

Djerroumi A., Nacef M. 2004. 100 plantes médicinales d'Algérie. Ed Palais du livre.

DORMAN et DEANS, 2000 : J Appl Microbiol. 2000 Feb;88(2):308-16. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils.

Doumbouya M., ABO K., Lepengue A.N., Camara B., Kanko K., Aidara D., Kone D. , 2012. Activités comparées *in vitro* de fongicides de synthèse et deux huiles essentielles, sur des champignons telluriques des cultures maraichères en côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences* 50. P: 3520-3532.

Douzane M., Nouani A., Brahim A., Bellal M. 2010. Influence de la variété, de la campagne oléicole et de la région sur la composition en acides gras de quelques huiles d'olive vierges algériennes. Eur. J. Sc. Res., 46 (3) : 339-351.

Duling E.N., Owen J.C., John B.G., Rosmary F.W., Kevin A.M., Yeap L.F., et Nigel

○ **E**

El Modafar C., El Boustani E., Aganchich B., Rahioui B., Boulouha B. 2002. mécanismes biochimique impliqués dans la défense de l'olivier vis-à-vis de la

Engelhard A.W. 1957. Host index of *verticillium albo-atrum* Reinke et berthold (including *verticillium dahliae* Kleb.) Plant Dis. Repr., 244: 23-29.

○ **F**

Fahault, 1886 : Original publication: Bornet, É. & Flahault, C. (1886 '1888'). Revision des Nostocacées hétérocystées contenues dans les principaux herbiers de France (quatrième et dernier fragment). Annales des Sciences Naturelles, Botanique, Septième Série 7: 177-262.

Faustino de Andres C. 1965. Enfermedades Y plagas del olives. Pub. Del Ministerio de l'Agricultura, Madrid, Spain, 296pp.

Fouin J., Sarfati C. 2002. Le guide des huiles d'olive. Editions du Rouergue, 225p.

Fradin E.F., Thomma B.P.H.J. 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium wilt* diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. Mol. Plant. Pathol., 7: 71-86.

Fravel D.R., Larkin R.P., 2000. Effect of sublethal stresses on microsclerotia of *Verticillium dahliae*, In: Tjamos, E.C., Rowe, R.C., Heale, J.B., Fravel, D.R.(eds), *Advances in Verticillium Research and Disease Management*. American Phytopathological Society (APS) Press, St. Paul, MN, USA. 301-306.

○ **G**

Gaouar-Benyelles N. 1996. Apport de la biologie des populations de la mouche de l'olivier *Bactrocera (Dacus oleae)* Gmel (Ditera: *Tephritidae*) à l'optimisation de son contrôle dans la région de Tlemcen. Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen, Algérie, 116 p.

Garber R.H., Houston B., 1966. Penetration and development of *Verticillium albo-atrum* in cotton plants. *J. Phytopathol.*, 56 : 1121-1126.

Garcia- Verdugo C., Forrest A.D., Balaguer L., Fay M.C., Vargas P. 2010. Parallel evolution of insular *Olea europaea* subspecies based on geographical structuring of plastid DNA variation and phenotypic similarity in leaf traits. *Bot. J. Linn. Soc.*, 162 : 54-63.

Gaussorgues R. 2009. L'olivier et son pollen dans le bassin méditerranéen. Un risque allergique ? *Revue française d'Allergologie*, 49 : S3.

Gigon F., Le Jeune R., 2010. Huile d'olive *Olea europaea* L. phytothérapie, 8 : 129-135. 1-2.

GRAINGE M., AHMED S. 1988. Handbook of plants with pestcontrol.

Green P.S., 2002. A revision of *Olea*. (*Oleaceae*). *Kew Bull.*, 57 : 91-140.

Guechi A., Girre L., 2002. Recherche et analyse d'un effet mutagène des extraits de feuilles d'olivier parasites par le champignon *Cycloconium oleaginum* Cast. *Sciences et Technologie*, Algérie, 18 : 96-100.

○ **H**

Hans W.K. 2007. 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition.

Harrisson A.C., Isaac I., 1969. Survival of causal agents of early- dying diseases (*Verticillium wilt*) of potatoes. *Ann. Appl. Biol.*, 63: 277-288.

Haslam E. 1994. Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. *Nat. Prod*, 11: 41-66.

Heffer, V. and R. Regan. 1995. *Verticillium* wilt of ash. *The Digger*. June: 48-49

Henni J.E. 1982. Contribution à la lutte contre le Verticilliose : facteurs physico-chimiques et biologiques inhibant la germination des microsclerotes de *Verticillium dahliae* Klebahn. Thèse. Doct. D'Etat. Univ. Paris (France). 150pp.

Henry S., 2003. L'huile d'olive: son intérêts nutritionnel, ses utilisations en pharmacie et en cosmétique. Thèse Doct. D'Etat. Pharmacie. Univ. Henry Poincaré, Nancy 1 (France), 10-90.

Hiemsta J. A. 1998. Some generale features of *verticillium wilt* in Trees. In: A ompendium of verticillium wilt in trees species. Ed. CPRO-DLO/HRI. Ponsen andlooijen, Wageningen/West-Malling. The Natherlands, pp.8-11.

Hiemstra J., Harris D. 1998. Compendium of *Verticillium wilt* in Tree Species. Ponsen & Looijen, Wageningen. The Netherlands.

Himelick E.B., 1969. Trees and shrub hosts of *Verticillium albo-atrom*. Biological otes, N°66. Illinois Natural History Survey. Urbana , Illinois, 8p.

Hoad T.F., 1991. The concise Oxford Dictionary of English Etymology.

○ **J**

JABNOUN-kHIAREDDINE H ; Daami-Remadi m ; Father A ; Hibar K ; El Mahjoub M. 2006. Pathogenicity of Tunisian isolates of three *Verticillium* species on Tomato and Aggplant. Plan. Pathol. Journal 5 (2): 199-207.

Jimenez-Diaz R.M., Tjamos E.C., Cirulli M. 1998. *Verticillium* wilts of major tree hosts. In. J. Hiemsta, & D. Harris (Eds). Compendium of *Verticillium wilt* in tree species (pp. 55-57). Wageningen, The Netherlands: Ponsen and Looijen, pp. 13-16.

JORDAN M.J., Martnez R.M., Martí'nez C., Moníno I., Sotomayor J. A., 2009. Polyphenolic extract and essential oil quality of *Thymus zygis* ssp. *gracilis* shrubs cultivated under different watering levels. Industrial crops and products 2 9; 145–153.

Julien J., 2005. Verticilliose des arbres ; la mort par apoplexis. PHM-Revu. Horticol. 474/44-47.

○ **K**

Kaiser S.A.K.M. 1972. Physical factors that influence the growth and spread of charcoal rot pathogen (*Macrophomina phaseolina*) infecting maize. J. phytopathol., 123: 47-51.

Katan J. 1981. Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pests. Annu. Rev. Phytopathol., 19: 211-236.

Kenjeric D., Monschein V., Riederer P., et schreir P. 2008. Flavonoids pattern of

Khadaril B., Achtaki H., Hmimsa Y., Ater M., Kjellberg F., Aumeeruddy-Thomas Y. 2005. Comprendre les processus de domestication et de diversification variétale chez les espèces fruitières méditerranéennes : une démarche au correfour de la génétique et de l'ethnobiologie. XIes Journées Scientifiques du réseau « Biotechnologies végétales/ Amélioration des plantes et sécurité alimentaire » de l'agence universitaire de la Francophonie. p 17.

Klebahn H.1913. Beitrage zur Kenntnis des Fungi Imperfecti I. Eine *Verticillium-Krankheit auf Dahliaen*. Mycologisches Zentralblati 3 : 49-66.

Klosterman SJ., Atallah Zk., Vallad GE., Subbarao K.V. 2009. Diversity, pathogenicity and management of *Verticillium* species. Annu. Rev. Phytopathol., 47: 39-62.

Kumar R., Tapwal A., Kumar Borah R. 2012. *Verticillium wilt* infecting *Parkia roxburghi* seedling in Manipur india. Academic Journal Inc., 1-6.

○ L

Lang J., Hu J., Ran W., Xu Y., Shen Q. 2012. Control of cotton *Verticillium wilt* and fungal diversity of rhizosphere soils by bio-organic fertilizer. Boil., Fertil., Soil., 48: 191-203.

Laouane H., Lazrek H.B., Sedra M.H. 2011. Synthesis and toxicity evaluation of cinnamyl acetate: a new phytotoxin produced by a strain of *Verticillium dahliae* 252 pathogenic on olive tree. Intl. J. Agr. Boil., 13: 444-446.

Leach C.M. 1962. The quantitative relationship of UV and visible radiation to the induction of reproduction in *Ascochyta pisi*. Can. J. Bot., 40 : 1577-1602.

Lemanceau, P., Alabouvette, C. and Couteaudier, Y., 1989. Recherches sur la résistance des sols aux maladies, modification du niveau de réceptivité d'un sol résistant et d'un sol sensible aux fusarioses vasculaires en réponse à des apports de fer ou de glucose. *Agronomie*, 8: 155-162.

Leroy I. 2011. L'huile d'olive dans tous ses états. Thèse. Doct. D'Etat. Univ. Lille 2 (France). pp 143.

Lima C.F., Patricia C., Valentao R., Andrade P.B., Seabra.R.M., Fernandes-Ferreira.M., Pereira-Wilson C. 2007. Water and méthanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from t-BHP induce oxidative damage. *Chemiobiological interaction.*, 167 : 107-115.

Linné C. 1764. Reisen durch einige Schwedische Provinzen. Erster Theil welcher die Reisen durch Oeland und Gothland enthalt. Pp 1-34.

Liu S.P., Zhu Y.P., Xie C., Jue D.W., Hong Y. B., Chen M.A.K., Hubder Q., 2012. Yang Transgenic Potato Plants Expressing StoVel Exhibit Enhanced Resistance to *Verticillium dahliae*. *Plant. Mol. Biol. Rep.*, 1-8.

LOLA J ; Mehna A.M; Abou Chaar M; Selti M.N; Adama F. 2011. Diversité génétique de *Verticillium dahliae* Kleb, agent causal de la verticilliose du coton en Syrie. *Arab. J. PI. Prot.* Vol. 29, N. 1. 8p.

Longaray Delmare A.P., Ivete T.M.P., Liane A., Luciana A.S., Sergio E. 2007. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* and *Salvia triloba*

Lopez-Escudero F.J., delRio C., Caballero J.M., Blanco-Lopez M.A., 2004. Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 79-85.

Lopez-Escudero F.J., Marcado-Blanco J. 2010. Verticillium wilt of olive : a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant, Soil.*, 1-50.

Loubelo A.C. 1992. Contribution à l'étude de la pourriture noir des racines de pois chiche causée par *Fusarium solani* (Mart) Appel UJR caractérisation et pathogénicité thèse ing. Agr Chelef 97p.

Loureiro J., Rodriguez E., Costa A., Santos C. 2007. Nuclear DNA content estimations in wild olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sylvestris* Brot.) and Portuguese cultivars of *O. europaea* using flow cytometry. *Gen. Res. Crop Evol.*, 54: 21-25.

lousert R., Brousse G. 1978. L'olivier. Technique agricole et productions méditerranéennes. (Eds) Maisonneuve et Larose, Paris (France), 480p.

Lu Y., Foo L.Y 2000. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace, *Food Chem.*, 68, 81-85.

Ludbrook W.V., 1933. Pathogenicity and environmental studies on *Verticillium* sp. *Phytopathology*, 23: 117-154.

Lumaret R., Ouazzani N., Michaud H., Vivier G., Deguilloux M.F., Di Giusto F. 2004. Allozyme variation of oleastre populations (wild olive tree) (*Olea europaea* L.) in the Mediterranean Basin. *Heredity*, 92: 343-351.

o M

Ma P., 2003. Biological control of *Verticillium* wilt. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 7 (3): 38-44.

Maksimovic M., DAnijela V., Mladen M., Marija E.S., Sabaheta A., et Sonja S.Y. 2007. Effet of the environmental condition on essential oil profile in two dinaric *Salvia* species : *Salvia brachydon vandas* and *Salvia officinalis* L. *Biochemical Systematics and Ecology*. **35** : 473-478.

Martin-Lapierre A., 2011. Application de composts et de fumigants pour lutte contre la Verticilliose (*Verticillium dahliae*) du fraisier. Thèse. Doc. D'Etat. Univ. Laval (Canada). 108p.

Masterova I., Uhrin D., Kettmann V., et Suchy V. 1989. Phytochemical study of *Salvia officinalis* L. Chemical Papers., **43** : 797–803.

Matallah-Boutiba. 1998. La verticilliose de l'olivier: Approches cyto-histologique et ultrastrucyure des interactions olivier-*Verticillium dahliae* Kleb. Mémoire de magistère. Université d'Oran, 105 p.

Mckeen C.D., Thorpe H.J., 1973. Pathogenic species of *Verticillium* in horticultural crops and weeds in southewestern Ontario. Can.J. Res. Sect., **21**: 95-117.

Meddad-Hamza A., Beddiar A., Gollotte A., Gianinazzi S. 2011. Management des mycorrhizes chez l'olivier. In : Mycorrhizal symbiosis in Mediterranean and tropical areas and its potential application. Ed. Duponnois R. & Hafidi M., Editions Nova Science Publishers, Inc. New York. USA.

Meddad-Hamza A., Beddiar A., Gollotte A., Lemoine M.C., Gianinazzi S. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi improve the growth of olive trees and their resistance to transplantation stress. Afr. J. Biotechnol. Vol. 9 (8), pp. 1159-1167.

Mercado-Blanco J., Rodriguez-Jurado D., Hervas A., Jimenez-Diaz R.M. 2004. Suppression of *Verticillium wilt* in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. Biological Control. **30**: 474-486.

Mesian C.M., Lafon R., 1970. Les maladies des plantes maraichères. 2^{ème} (eds.). I.N.R.A, France, 441 p.

Metoui O; Zerouk M. 2006.Caracterisation morphologique et culturale des champignons *Verticillium dahliae* responsable de dépérissement de l'olivier en Tunisie. Actes de séminaire international « les plantes à parfum, Aromatiques et médicinales » SIPAM.

Morettini A., Bini G., Bellini E. 1972. Comportamente di alcune cultivar di olivo de tavola francesi spagnole nella Maremma Toscano. Rev. Della Orto-Floriofrutticoltura Ital., **56** : 3 13.

Mukesh Nandave, S K Ojha and D S Arya. 2005. Protective role of flavonoids in cardiovascular diseases.

○ N

Nagzaam M.P.M., Termorshuizen A.J., Bollen G.J., 1997. The relationship between soil inoculum density and plant infection as a basis for a quantitative bioassay of *Verticillium dahliae*. European. Journal of Plant Pathology, **103**: 597-605.

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. Marcel Dekker, New York, 293-355.

Nasles O. 2006. L'olivier, outil d'entretien du territoire dans les pays méditerranéens. *Nouvel Olivier*, 52 : 3-5.

Nées, von., Esenbeck,GG. 1817. Systemder Plize Urid Schwamme, Wurzburg. 234 pp.

Nicot P.C., 2002. Lutte biologique avec des micro-organismes contre les maladies aériennes : situations actuelle et perspectives de développement. 2^{ème} Conférence Internationale sur les moyens alternatifs de lutte contre les organismes nuisibles aux végétaux, 4-7 mars, Lille, France, p 28-36.

○ **O**

of Agricultural and Food Chemistry., **48** : 235–238.

Ozgenturk O.N., Oruç F., Sezerman U., Kuçukural A., Korkut S.V., Toksoz F., 2010. Comparative and Functional Genomics-Generation and Analysis of Expressed Sequence Tags from *Olea europaea* L. ID 757512 ., 9p.

○ **P**

Pagnol J. 1975. L'olivier . Edition Aubanel, 180 p.

Parker C. A. 1959. *Analyst*, 84, 446.

Pegg G.F., Brady B.L., 2002. *Verticillium wilts*. Cromwell Press, Trowbrige, 552p. *phytopathology*, 26 : 75-91.

Percy E., Newberry M.A. 1937. On some African species of the genus *Olea* and the original home of the cultivated olive tree. Part 1. Linnean Society of London. London.

Pearce G.D., Gibbs J.N., 1981. *Verticillium wilt* of trees and shrubs. Arboricultural leaflet,9. Dept of the environment, Forestry. Commission. HMSO, London, 8p.

Pineau R., 1976. Etude sur les trachéomycoses de la tomate au Maroc. Thèse Docteur-ingénieur, Univ. Nancy I, France, 128p.

○ **Q**

Qatibi A.L., Elasli A., Lorquin J., Liebgott P.P., Bennisse R., Labat M. 2004. Potentialité des bactéries pour la valorisation des margines d'olives. Cas d'une bactérie isolée d'un bassin d'évaporation de margines situé au Maroc. Séminaire International Olivebioteq, Errachidia, Maroc. 147 p.

○ **R**

- Radulescu V., Silvia C., et Eliza O. 2004.** Capillary gas chromatography-mass
- RAMUALDE N. 1992.** Influence des conditions de culture sur la croissance de *Verticillium dahliae* et diversité du pouvoir pathogène de champignon vis-à-vis du Cotonnier. Métrise de physiologie végétale appliquée. Univ Montpellier (France). 34p.
- RAPPILY F. 1969.** Techniques de mycologie en pathologie végétales. Ann epiphyties ; 102p.
- REGRAGUI A. 2005.** Contribution à l'étude de l'influence de la salinité sur le couple Tomate-Verticillium : conséquences physiologiques et impact sur la bioprotection des tomates contre la Verticilliose. Doct. D'Etat. Univ Mohammed V Agdal (Maroc). 257P.
- Rhizoupoulou S. 2007.** *Olea europaea* L. a botanical contribution to culture. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 2 (4) : 382-387.
- Rieuf M., 1970.** Le dépérissement des abricotiers. I. Etat des recherches en France et à l'étranger. II, Situation et recherche en Maroc. Fruits Primeurs, 192 : 354-357.
- Rouhani H., Davet P., Poinso B., Beyries A., Messiaen C.M. 1979.** Inventaire et évaluation du pouvoir pathogène des composants de la microflore fongique sur raciness de maïs en France. Ann. Phytopathol., 11 (1): 69-93.
- Rubio de Casas R., Besnard G., Schoenswetter P., Balguer L., Vargas P. 2006.** Extensive gene flow blurs phylogeographic but not phylogenetic signal in *Olea europae* L. Theoretical and Applied Genetics 113: 575-583.
- Ruggieri G.,1946.** Una nuova malattia dell olivo. L'Italia Agricola, 83 : 369-372.
- S
- Saad D., 2009.** Etude des endomycorhizes de la variété Sigoise d'olivier (*Olea europae* L.) et essai de leur application à des boutures semi-ligneuses multipliées sous nébulisation. Mém. Magis. Univ. Oran (Algérie). 124p.
- Sagdullaeva at al., 1972.** International Collation of Traditional and Folk Medicine: Northeast Asia ... publié par Ji-Xian Guo,Takeatsu Kimura,Paul P H But,Chung Ki Sung.
- sage (*Salvia officinalis*) unifloral honey. Food chemistry., **110** : 187-192.
- Sahli Z. 2009.** Le développement Local Durable des Pays Méditerranéens. Les produits de Terroir. Les Indications géographiques et le Développement Local Durable des Pays Méditerranéens. Options méditerranéennes. A n° 89. 306-316.
- SAIAH F. 1996.** Etude de la résistance des sols à la fusariose causée par *Fusarium oxysporum* fsp mélonis dans la plaine du Chellif.

Sanei S.J., Razavi SE., Okhovvat S.M., Pahlavani M.H. 2010. *Verticillium wilt* Peik-e-Reihan publication, Gorgan, 652p.

Saremi H., Amiri M.E., Mirabolfathi M. 2010. Application of soil solarization for controlling soilborne fungal pathogens in newly established pistachio and olive orchards, *Int. J. Fruit. Sci.*, 10: 143-156.

Sarni-Manchado P., Cheynier V. 2006. Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Lavoisier.

Sasanelli N. 2009. Olive nematodes and their control: Integrated Management of Fruit Crops and Forest Nematodes A. Ciancio & K.G. Mukerji (eds.). Bari (Italy), 1-41.

Schnatborst W.C., Mathre D.E. 1966. Host range and differentiation of a severe form of *Verticillium albo-atrum* in cotton. *Phytopathology*, 56: 1155-1161.

SEDRA H, 2002. La Verticilliose de l'olivier dans la région du Haouz au Maroc : répartition, importance et premières résultats de recherche. Séminaire international sur l'olivier, acquis de recherche et contraintes du secteur oléicole. 14 au 16 Mars. Marrakech (Maroc) 280-293.

Simandirakis V., Lykoudi M. 2002. The olive 'Kallistephanos'. Ephesus Publishing.

Sinclair W.A., Hudler G.W., 1984. *Verticillium wilt*. Cornell Tree Pest Leaflet. A-3 (revised), 8p.

Skadow K., 1969. Untersuchungen über die Welkeerreger *Verticillium albo-atrum* Reinke et Bertbold und *Verticillium dahlia* Kleb. I. Unkrauter an Wirtsflanzen. *Z. bl. Bacteriol. Parasitenk. Infektionskrankh. Hygiene*, 123 : 715-735.

Smith H.C., 1965. The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahlia*, and *V. trichorpus*, *N.Z.J. Agric. Res.*, 8: 450-478.

spectrometry of volatile and semi volatile compound of *Salvia officinalis*. *Journal of*

Statistiques Agricoles et Des Systèmes D'information (DSASI-MADR), 2014. www.FAO.org, consulté le 13/02/2016.

Stevens R.M., Douglas T. 1994. Distribution of grapevine roods and salt under drip and full ground cover microjet irrigation systems, *Irrigation Sci.*, 15: 147-152.

Strikis D., Hellal F., Hurtado A., Ruschel J., Flynn K.C., Laskowski C.J., Umlauf M., Kapitein L.C., Lemmon V., Bixby J, Hoogenraad CC, Bradke F., 2010. Study of development and classification of different plants. 34: 19-30p.

structural elucidation of two new glycosides from sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal*

TERRAL J F., ALONSO N., BUXO I., CAPDEVILLA R., CHATTI N., FABRE L., FIORENTINO G., MARINVAL P., PEREZ JORDA G., PRADAT B., ROVIRA N., ALIBERT P., 2004. Historical biogeography of olive domestication (*Olea europea* L) as revealed by geometrical morphometry applied to biological and archeological material. Journal of Biogeography, 31:63-77p.

Thanassoulopoulos C., Biris D.A., Tjamos E.c., 1981. Weed hosts as inoculum source of *Verticillium* in olive orchads. Phytopathol, Medit, 20: 164-168.

TLEMSANI M. 2010. Contribution à l'étude de flétrissement vasculaire du pois chiche causé par *Fusarium oxysporum* Schelch. Emend et hans.f. sp. Ciceri (Padwich) : caractérisation. Lutte biologique et comportement variétal. Mém. Magis. Univ. Oran (Algérie). 163p.

Tombesi A., Tombesi S., Saavedra M.S., Fernandez-Escobar R., d'Andria R., Lavini A., Jardak T. 2007. (Eds). Conseil Oléicole Internationale. Technique de production en oléiculture. Madrid (Espagne). ISBN. 1^{ère} édition, 348p.

Triki M.A., Hassairi A., Mahjoub M. 2006. Premières observations de *Verticillium dahliae* sur olivier en Tunisie. Bull EPPO Bull., 36 (1): 69-71.

○ U

Uppal A.K., El Hadrami A., Adam L.R., Tenuta M., Daayf F. 2008. Biological control of potato *Verticillium wilt* under controlled and field conditions using selected bacterial antagonists and plant extracts. Boil. Control ., 44: 90-100.
using ethanol-water mixture. Food chemistry., **101** : 1417- 1424.

○ V

Vallad G.E., Subbarao K.V. 2008. Colonization of resistant and susceptible lettuce cultivars by a green fluorescent protein-tagged isolate of *Verticillium dahliae*. Phytopathology. 98: 871-885.

Velitzelos E., Velitzelos D. 2005. Geohistorical evidence on the evolution of plants in the Aegean Sea. In Biodiversity and natural heritage in the Aegean. Eds., Karamanos, A. J. and C. A. Thanos. The Agricultural University of Athens, 133-148.

verticilliose . thèse de doctorat ; universite de Mohamed 5 Rabat.pp :296-312.

Vigouroux A., 1971a. Aptitude des pathogènes et spécificité parasitaire du *Verticillium albo-atrum*. Compte-rendu d'une réunion sur les verticillioses. (Abs). I.N.A.P.G., (8564).

Vigouroux A., 1975. *Verticillium dahliae*, agent d'un dépérissement de l'olivier en France. Ann. Phytopathol., 7 : 37-44.

○ **W**

Wagner W.L., Herbst D.R., Sohmer S.H. 1999. Manual of the flowering Plants of Hawaii. 2 vols. Bishop Museum Special Publication 83, University of Hawaii and Bishop Museum Press, Honolulu, HI.

Wang M., Kikuzaki H., Zhu N., Sang S., Nakatani N., Ho C.T. 2000. Isolation and

Wang M., Li J., Rangarajan M., Shao Y., La Voie E.J., Huang T.C., Ho C.T. 1998.

Wilhelm S. 1951. Effect of various soil amandement on the inoculum potential of the *Verticillium* wilt fungi. *Phytopathology*, 41: 684-690.

Wilhelm S., 1955. Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. *Phytopathology*, 45: 180-181.

○ **Y**

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.

○ **Z**

Zhang H.J., Li L.N. 1994. Salvianolic acid : a new depside from *Salvia cavaleriei*. *Planta Medica.*, 60 : 70–72.

Zohary D., Hopf M. 2000. Domestication of plants in the Old World. Third edition. Oxford University Press . New York.

Résumé

Notre travail, a porté sur deux parties la première, est l'étude de l'influence des facteurs abiotique (milieu, température, humidité, pH) sur la croissance mycélienne et la sporulation. La seconde, concerne l'étude de l'activité de l'extrait polyphénolique d'une plante médicinale et aromatique *salvia officinalis* (Lamiaceae), "in vitro" et "in vivo".

Les résultats de l'étude de l'influence des facteurs abiotique nous ont permis de déterminer les conditions optimum pour une bonne croissance mycélienne et sporulation de *Verticillium* sp.

Les résultats du test "in vitro" de l'effet de la sauge sur la croissance mycelienne et la sporulation montre une corrélation entre les doses des extraits et les taux d'inhibition. En effet, plus la dose de l'extrait est élevée, plus la croissance mycélienne est faible.

In vivo, non seulement l'extrait méthanoïque des feuilles de sauge n'a présenté aucun effet préventif, mais paraît amplifier l'agressivité des isolats.

Mots clés : *Salvia officinalis*, croissance mycélienne, sporulation, *Verticillium* sp., extrait polyphénolique.

Abstract

Our work focused on two parts. The first is the study of the influence of abiotic factors (environment, temperature, humidity, pH) on mycelial growth and sporulation. The second concerns the study of the activity of the polyphenolic extract from a medicinal plant and aromatic *Salvia officinalis* (Lamiaceae), "in vitro" and "in vivo".

The results of the study of the influence of abiotic factors have enabled us to finish the optimum conditions for good growth and sporulation of mycelial *Verticillium* sp.

The test results "in vitro" effect of the sage on the mycelial growth and sporulation shows a correlation between the doses of extracts and inhibition rates. Indeed, the higher the dose of the extract, the greater mycelial growth is low.

In vivo, not only methanoic extract of sage leaves showed no preventive effect, but appears to amplify the aggressiveness of the isolates.

Key words: *Salvia officinalis*, mycelial growth, sporulation, *Verticillium* sp, polyphenolic

Conclusion générale

Conclusion

A travers cette étude et d'après les résultats obtenus nous pouvons formuler un certain nombre de conclusions.

Le milieu le plus favorable au développement *in vitro* des deux isolats de *Verticillium* sp.1 est le Richards, suivi de près par le milieu PDT.

L'aspect des colonies diffère d'un isolat à l'autre, sur milieu Richards le mycélium est transparent, alors que sur milieu PDT, la colonie est recouverte de micro sclérotés ce qui lui confère une coloration noire.

L'optimum de croissance mycélienne et de la sporulation de *Verticillium* sp1 est enregistré à 25°C. alors que celui *Verticillium* sp2 est situé 22°C également permis une bonne croissance mycélienne. Cette dernière a été nettement inférieure sous l'effet de 22°C et 18°C.

la croissance mycélienne est favorisée par une atmosphère saturée en humidité. Cette dernière est réduite avec la diminution du taux d'humidité pour s'annuler à 14%.

aucune différence significative entre les croissances mycéliennes des deux isolats étudiés aux différents pH testés n'a été enregistrée. En parallèle, les deux isolats ont sporulé d'une manière intense comparativement aux autres tests.

L'évaluation de l'efficacité antifongique de l'extrait polyphénolique des feuilles de sauge, montre que cette dernière exerce une réduction importante de la croissance qui est proportionnelle avec la concentration. On note également que la dose de 75% a réussi à inhiber complètement la croissance mycélienne, elle est de ce fait la CMI.

L'étude de l'efficacité antifongique "*in vivo*" de l'extrait polyphénolique de la sauge sur l'agressivité de *Verticillium* sp. a été contraire à ce qu'on attendait. Non seulement l'extrait méthanoïque des feuilles de sauge n'a présenté aucun effet préventif, mais paraît amplifier l'agressivité des isolats. Il semble potentialiser l'attaque du pathogène.

D'après ces résultats, on peut penser que l'extrait phénolique de la sauge mérite une étude plus approfondie pour exploiter ses propriétés antifongiques dans le domaine de phytosanitaire. Cependant, il faudrait pouvoir déterminer les molécules bioactives responsables de cette action.

D'autre part il faudrait mettre au point un dispositif expérimental adéquat pour mettre en évidence les potentialités de cet extrait "*in vivo*".

Espérons que ces travaux, pourront aboutir rapidement sur des applications concrètes qui ouvriront de nouveaux débouchés à la filière des plantes aromatiques, médicinales et à parfum, tout en assurant la protection des cultures dans le respect de l'environnement.

INTRODUCTION GENERALE

PATRIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

L'olivier

(Olea europea)

CHAPITRE II :

La verticilliose de l'olivier
(*verticillium dahliae*)

CHAPITRE III :

Les polyphénols

PARTIE
EXPERIMENTALE

CHAPITRE I :

Matériel et méthodes

CHAPITRE II :

Résultats et discussion

CONCLUSION GENERALE

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Annexes