

## ***Liste des abréviations***

**μeg** : Microéquivalent gramme

**APG** : Acide polygalacturonique

**CAT**: Catalase

**CI50** : Concentration inhibitrice 50 % de la croissance mycélienne

**CI95** : Concentration inhibitrice 95 % de la croissance mycélienne

**Czp** : Milieu Czapeck

**DNS** : Acide 3,5-dinitrosalicylique

**Foa** : *Fusarium oxysporum* f. sp *albedinis*.

**NBT** : Nitro Bleu Tetrazolium

**PDA**: Potato Dextrose Agar.

**PERX** : Peroxydase

**PG** : Polygalacturonase

**pH**: potentiel d'Hydrogène.

**PL** : Pectine lyase

**PME** : Pectine méthylestérase

**SNA**: Synthetic Nutrient-poor Agar.

**SOD** : Superoxyde dismutase

**T%** : Taux d'inhibition

**U** : Unité

## Sommaire

Introduction	16
1) Palmier dattier	17
2) Position systématique	17
3) Ecologie du palmier dattier	17
4) Morphologie	18
5) Importance économique du palmier dattier	19
6) Les ravageurs et les maladies du palmier dattier	20
6-1) <i>Oligonychus afrasiaticus</i> . (Mc Gregor)	20
6-2) <i>Parlatoria blanchardi</i> Targ. (La cochenille blanche)	21
6-3) <i>Myelois ceratoniae</i> Zell (Pyrale de la datte)	21
7) Les maladies fongiques	22
7-1) La pourriture de l'inflorescence ou Khamedj	22
7-2) La pourriture du Cœur à <i>Thielaviopsis</i>	23
7-3) La pourriture du bourgeon ou Belâat	23
7-4) Maladies à dépérissement « Lethal Yellowing »	23
7-5) Le Bayoud ou Trachémycose du palmier	24
8) L'agent pathogène <i>Fusarium oxysporum</i>	25
8-1) Taxonomie	25
8-2) Caractères physiologiques	26
8-3) Caractéristiques morphologiques	26
8-4) Variabilité de la morphologie	26
8-5) Formes de reproduction	27
8-6) Cycle de vie	29
9) Pathologie de la fusariose vasculaire	31
10) Symptômes	33
10-1) Symptômes externes	33
10-2) Symptômes internes	33
10-3) Variabilité du pouvoir pathogène	34
11) Effets des agents pathogènes sur la paroi de l'hôte	35
12) Composants de la paroi cellulaire de l'hôte	35
12-1) Cellulose	35
12-2) Hémicelluloses	36
12-3) Pectine	36
13) Principales enzymes de la dégradation synthétisées par les parasites	36

13-1) La pectine méthylestérase (PME)	37
13-2) Pectinestérases (PE) ou pectine méthylestérase (PME)	37
13-3) L'hydrolyse: la polygalacturonase (PG) et la pectine méthylgalacturonase (PMG)	40
13-4) Les lyases ou transéliminases	41
13-5) Transéliminase pectinolytique (PTE)	41
14) Moyens de lutte	43
14-1) Lutte génétique	43
14-2) Lutte cultural	43
14-3) Lutte biologique	43
14-4) Lutte chimique	45
14-4-1) Les dérivés azoles	46
14-4-2) Mode d'action biochimique	46
15) Les principales enzymes du système antioxydant	47
15-1) La superoxyde dismutase	47
15-2) La Catalase	47
15-3) L'activité ascorbate peroxydase	48
<b>Matériels et Méthodes</b>	
1) Isolement et purification	49
2) Culture monospore	49
3) Test de pouvoir pathogène	50
3-1) Préparation du matériel végétal	50
3-2) Préparation de l'inoculum	50
3-3) Infection et notation	50
3-4) Ré-isolement du champignon	51
4) L'évaluation de la croissance mycélienne des isolats de <i>Foa</i> vis-à-vis de différents sources de carbones	51
5) Recherche de l'activité pectinolytique des isolats de <i>Foa</i>	53
5-1) Dosage de l'activité Pectine méthylestérase (PME)	53
5-2) Dosage de l'activité Polygalacturonase PG	53
6) Etude des différents facteurs influençant sur l'activité pectinolytique	55
6-1) Dosage de l'activité Polygalacturonase PG	55
6-2) Dosage de la pectine lyase	56
7) Test de l'activité antifongique des triazoles <i>in vitro</i>	57
7-1) Action des triazoles sur la croissance mycélienne	57
7-2) L'influence des molécules sur les activités enzymatiques	58
7-2-1) Préparation des extraits enzymatiques	58

7-2-2) Dosage de la peroxydase	58
7-2-3) Détection de l'anion superoxyde	59
8) Analyse statistiques	60
<b>Résultats et Discussion</b>	
1) Résultats de l'isolement des souches de <i>Fusarium oxysporum f.sp albedinis</i>	63
2) Pouvoir pathogène des isolats	67
3) Influence des substrats sur la croissance mycélienne	75
4) Recherche de l'activité pectinolytique	77
4-1) Dosage de l'activité Pectine méthylestérase	77
4-2) Dosage de l'activité Polygalacturonase	77
5) L'influence du pH sur la croissance mycélienne	80
6) L'influence des substrats et temps d'incubation sur l'activité pectinolytique :	81
6-1) Activité enzymatique Pectine méthylestérase (PME)	81
6-2) Activité enzymatique de pectine lyase	84
6-3) Activité enzymatique polygalacturonase	86
6-4) Analyse des effets individuels des facteurs	89
<b>Discussion</b>	
7) Influence des molécules sur la croissance mycélienne de l'isolat F1	94
7-1) L'activité de la superoxyde dismutase	98
7-2) La peroxydase	100
Discussion	102
Conclusion	104
Références bibliographiques	106
Annexes	115

## ***Introduction***

Le Bayoud est sans concurrent la maladie la plus dangereuse du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*), c'est un véritable fléau dans les régions de la culture des palmiers dattier en Afrique du nord. Il représente une menace pour les régions indemnes. A cause des dommages qu'il cause à l'environnement et à la santé, provoqués par l'utilisation des pesticides qui servent à éradiquer les pathogènes des plantes et des récoltes, pour cela la compréhension des mécanismes qui conduisent à la pathogénicité est devenue une question fondamentale pour les phytopathologistes. Le champignon phytopathogène, il achève au moins une dégradation partielle des matières qui constituent les parois cellulaires des plantes (Reignault *et al*, 2008).

*Fusarium oxysporum*, comme d'autre pathogène vasculaire, produit facilement un assortiment d'enzymes qui dégrade la plupart des composants des parois cellulaires et plus particulièrement la cellulose et les polymères constitués essentiellement d'acide anhydrogalacturonique. Les travaux réalisés par (El Moudafar et El Boustani, 2000), montrent que la croissance et le développement de l'agent causal du Bayoud, *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* dans un milieu minéral qui renferme les parois cellulaires des racines du palmier dattier, comme seule source de carbone, sont liés à la production des enzymes extracellulaires qui dégrade les parois cellulaires.

Ce travail a pour objectif d'étudier la variabilité morphologique des isolats et de déterminer leurs degré de pathogénicité vis-à-vis des plantules du palmier dattier, et de mettre en évidence par dosage de pectine méthylestérase et polygalacturonase et de corrélérer la relation entre ces enzymes et le pouvoir pathogène des isolats de *Foa*, et étudie des différents facteurs comme sources de carbone (pectine de citron, acide polygalacturonique et glucose), différents pH et durée d'incubation sur l'activité PME, PG et PL. Ensuite nous avons déterminé la concentration inhibitrice 50% (CI50) et la concentration d'inhibitrice 95% (IC95) de quelques molécules triazoles et ammonium quaternaire vis-à-vis de l'isolat KN1, puis nous avons étudié les stress provoqués par ces molécules sur l'isolat KN1, par l'étude biochimique de deux enzymes superoxyde dismutase et peroxydase.

### 1) Palmier dattier

Le palmier dattier est l'arbre fruitier par excellence du désert saharien où il joue à la fois un rôle économique grâce à la production des dattes qui constituent la base de l'alimentation humaine et animale, et un rôle écologique puisqu'il confère sa structure à l'oasis. En effet, il protège du vent et de l'avancée du sable tout en créant sous son couvert un microclimat favorable au développement de nombreuses cultures annexes.

Les palmeraies traditionnelles sont organisées en trois strates de cultures : les palmiers dattiers, les arbres fruitiers ou arbustes et des cultures céréalières, fourragères ou maraîchères. Toutes ces productions conditionnent l'économie de l'oasis et la stabilité des populations qui y vivent (Fernandez *et al*, 1995).

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), une plante pérenne, est l'élément essentiel de l'écosystème oasien des régions sahariennes et présahariennes. Sa distribution géographique est assez large dans l'hémisphère Nord. Cette espèce fruitière est connue pour sa tolérance aux conditions climatiques extrêmes d'aridité et de continentalité. Il permet la création d'un milieu typique favorable à la pratique d'autres cultures sous-jacentes (arboricoles, céréalières, maraîchères...), garantissant ainsi une certaine autonomie économique du milieu oasien. En outre, les diverses utilisations du palmier dattier et de ses produits dans la vie des habitants des oasis montrent le rôle primordial qu'il tient dans ces régions (Munier, 1973).

### 2) Position systématique

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une monocotylédone pérenne dioïque de l'ordre des Palmales, famille des Palmaceae ou Arecaceae. Le dattier fait partie de la tribu de Phoeniceae qui ne comporte qu'un seul genre : *Phoenix* (Arib, 1998).

### 3) Ecologie du palmier dattier

Le palmier dattier est une plante spontanée dans la plupart des régions du vieux monde où la pluviométrie est inférieure à 100mm (Arib, 1998). Les limites extrêmes de la culture du palmier dattier s'étendent entre le dixième degré de

latitude nord (Somalie) et le 39ème degré (Elche en Espagne ou Turkménistan en ancien URSS). Les zones les plus favorables sont comprises entre le 24ème et le 34ème degré de latitude nord (pays du Maghreb, Iraq..).

Quelques surfaces de culture existent dans l'hémisphère sud (Australie, Amérique du sud). Le palmier dattier est une espèce thermophile. Sa végétation s'arrête à partir de 10°C (zéro de végétation). L'intensité maximale de végétation est atteinte à des températures de 30-40°C. La période de maturation des fruits correspond aux mois les plus chauds de l'année (Baaziz, 2003). Le nombre de palmiers dattiers dans la rive méditerranéenne sud est variable d'un pays à l'autre. Il est plus élevé en Algérie où la composition variétale est restreinte (45 % du cultivar « Deglet Nour ») (Baaziz, 2003). Un aperçu sur leurs nombres est mentionné sur le **Tableau 01**.

**Tableau 01:** Aperçu sur le nombre de palmiers dattier et la composition variétale des palmeraies de quelques pays de la rive sud de la Méditerranée (Baaziz, 2003).

<b>Pays</b>	<b>Nombre (Millions)</b>	<b>Composition variétale</b>
Algérie	9.0	Diversifiée
Maroc	5.0	« Deglet nour »
Tunisie	3.0	« Deglet nour »
Mauritanie	1.0	-
Libye	7.0	-
Egypte	7.0	Diversifiée

#### **4) Morphologie**

Le palmier dattier étant une monocotylédone arborescente et dioïque, son tronc (ou stipe) mesure de 15 à 30 mètres, et contient de nombreux faisceaux libéro-ligneux, très enchevêtrés et dont on ne peut suivre le parcours (Arib, 1998).

Le stipe possède un seul bourgeon terminal qui assure sa croissance en longueur, et se termine par un bouquet de palmes. Celles-ci sont insérées suivant des hélices foliaires (Bouguedoura, 1979).

Le système racinaire est très développé, (Saaidi, 1979) estime le nombre des racines, est estimé à plus d'un millier par arbre. Les racines ne se ramifient pas et n'ont relativement que peu de radicules. Le bulbe, ou plateau racinal, est volumineux et émergé en partie au dessus du niveau du sol (Munier, 1973).

La feuille (ou palme) est à limbe entier au début du développement, par la suite elle devient composée pennée de 4 à 7 mètres. A la base de chaque palme, des folioles sont transformées en épines très dures. Le pétiole (ou rachis) est constamment dur.

Les inflorescences du dattier sont grappes d'épis et sont enfermées dans une spathe qui s'ouvre à leur maturité. Un seul ovule par fleur est fécondé et un seul carpelle se développe pour donner le fruit qui est « la datte ».

Le fruit, ou la datte est une baie, constituée d'un mésocarpe charnu, protégé par un fin péricarpe et contenant une seule graine entourée d'un endocarpe membraneux. La graine est de forme oblongue, souvent lisse avec un sillon ventral et un embryon dorsal (**figure 01**). L'albumen est dur et corné et la germination est hypogée (Bounaga, 1991).

La pollinisation se fait par le vent (anémophilie), cependant en culture, le nombre réduit de palmiers mâles (en Algérie, où ils sont appelés dokkars, on en compte souvent un pour 100 pieds femelles) oblige à pratiquer une pollinisation artificielle.

### **5) Importance économique du palmier dattier**

Le potentiel phoenicicole algérien enregistre un accroissement important avec un effectif qui avoisine 15 millions de palmiers dattiers dont 11 millions productifs pour une superficie de plus de 350.000 hectares. Pour une campagne déterminée, la production nationale peut atteindre 500.000 tonnes, dont 240.000 tonnes représentant environ 47% de Deglet Nour, considérée comme étant la meilleure variété de dattes commerciales qui permet à l'Algérie de se hisser au premier rang mondial du point de vue qualitatif; alors que près de 2600.000 tonnes soit 53%, sont de variétés dites communes. Parmi ces derniers, 120.000 tonnes seulement sont

commercialisables et plus de 14.000 tonnes sont de très faibles valeurs marchandes (Ould El Hadj *et al*, 2006).

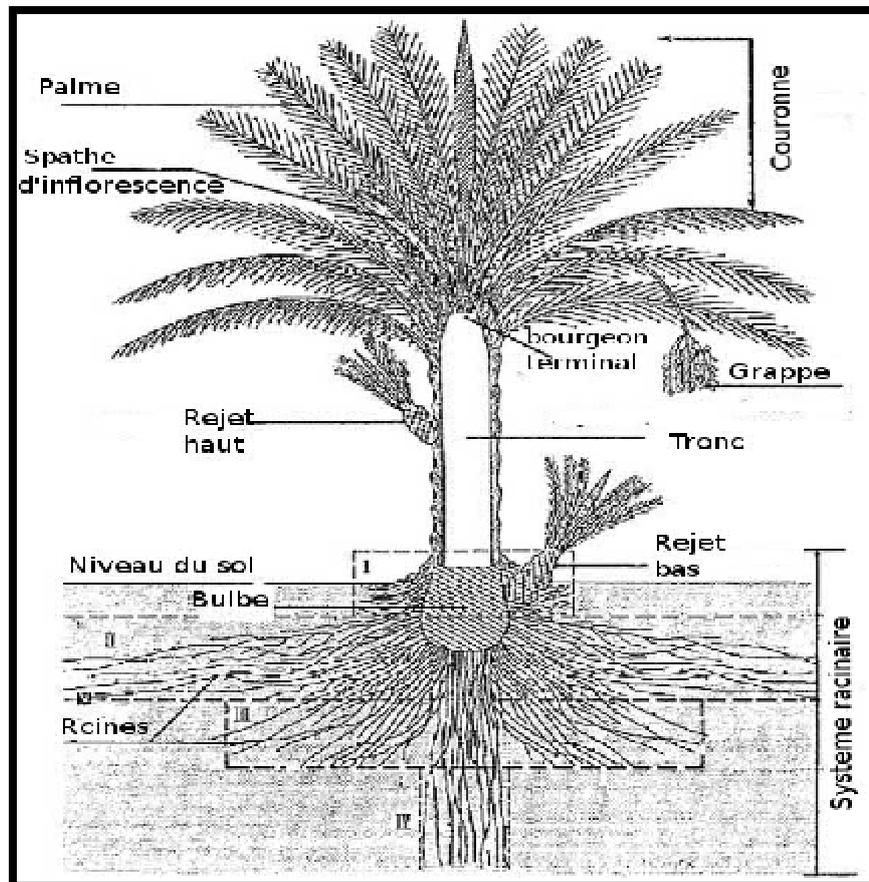


Figure 01 : Schéma du palmier dattier (Munier, 1973).

## 6) Les ravageurs et les maladies du palmier dattier

### 6-1) *Oligonychus afrasiaticus*. (Mc Gregor)

Mc Gregor, est le nom latin donné à un acarien appelé localement Boufaroua ou Ghobar au Maghreb, Takar en Mauritanie, Goubar en Irak. Il est présent dans tous les secteurs où pousse le dattier dans le vieux monde depuis la Mauritanie jusqu'au Golfe persique (Bounaga et Djerbi, 2009).

La présence des acariens sur les fruits est révélée par l'existence de toiles soyeuses blanchâtres ou grisâtres, et qui prend la couleur du sable ou de la poussière dont elle s'imprègne.

Aux Etats-Unis une autre espèce *Oligonychus pratensis* est signalée. (Vilardebo, 1973 et Vilardebo, 1975) détaille tout ce qui est connu sur cet acarien : biologie, comportement, moyens de luttés... Le poudrage au soufre reste le premier

traitement préconisé par les services de protection des végétaux des pays concernés. (Montaigne et Fall, 1986) recommandent de poursuivre les investigations sur les autres possibilités de lutte (lutte chimique, lutte biologique) en insistant toutefois sur l'entretien et le nettoyage des palmeraies.

### **6-2) *Parlatoria blanchardi* Targ. (La cochenille blanche)**

Cet insecte est très nuisible au palmier dattier, aussi bien par l'importance des dommages qu'il occasionne que par son extension géographique. La cochenille blanche (*Parlatoria blanchardi* Targ.), appelée 'Rheifiss' en Mauritanie, 'Guemla' au Maroc, 'Sem' en Algérie et 'Djereb' en Tunisie, cause des dégâts importants au palmier dattier. L'insecte se nourrit de la sève de la plante et injecte une toxine qui altère le métabolisme ; de plus, l'encroûtement des feuilles diminue la respiration et la photosynthèse et cause des altérations métaboliques, La cochenille peut entraîner une réduction de plus de la moitié de la production dattière, et rend les fruits inconsommables (Bounaga et Djerbi, 2009). Elle peut, également, attaquer les fruits et entraîner l'arrêt de leur développement (Viladerbo, 1973). L'utilisation de la coccinelle comme prédateur naturel de la cochenille blanche a fait l'objet de plusieurs travaux dans le cadre d'une lutte biologique contre l'insecte ravageur (Montaigne et Fall, 1986).

### **6-3) *Myelois ceratoniae* Zell (Pyrale de la datte)**

C'est le nom d'un ver qui infeste les dattes sur l'arbre (Arib, 1998) ; Lépidoptère de la famille des Phycitidae appelée aussi Pyrale de la datte. Après (Vilardebo, 1973 et Vilardebo, 1975; Leberre, 1978) fait une mise au point très complète sur ce parasite. Elle est connue au Maghreb et jusqu'en Libye et en Egypte et plus au Nord vers l'Espagne, l'Italie et la Grèce.

En Algérie, parmi les traitements chimiques recommandés c'est l'utilisation du Malathion à 2%, Parathion 1,25%, Phosalone 4% et Bactospéine 1%, à raison de 100 g/palmier, avec 100 g de chaux viticole. Cependant Bounaga et Djerbi (2009) demande l'arrêt des traitements, la première semaine de Septembre, à cause de la toxicité des produits. Il faudrait encore que cette recommandation tienne compte de la date de maturation des fruits qui est très variable suivant les variétés et les régions. Les essais de lutte biologique par les Hyménoptères- Braconidés ont été préconisés.

De nombreux autres prédateurs ont été signalés par (Carpenter et Elmer, 1978) mais dont l'importance est moindre.

### 7) Les maladies fongiques

Différents travaux de synthèse ont été publiés, dont : (Fawcett et Klotz, 1932), (Carpenter et Klotz, 1966), (Rieuf, 1970), (Laville, 1970 ; Laville, 1973)...etc., et plus récemment (Djerbi, 1988). Sans reprendre en détail ces maladies, citons parmi elles les phoéniculteurs que nous connaissons le mieux : le Khamedj, le Mejnoun, le Belaata, et enfin le Bayoud sur lequel se base cet étude.

#### 7-1) La pourriture de l'inflorescence ou Khamedj

Cette maladie est connue dans presque toutes les zones de cultures du dattier. C'est une maladie très grave qui sévit dans les régions de phoéniculteurs les plus humides ou pendant les années très humides. Dans ce cas, elle peut prendre des allures épidémiques. Elle est causée par un champignon imparfait de l'ordre des Hyphales, à chaînes de conidies hyalines, fragmentés en articles mono ou bicellulaires *Mauginiella scaetae*. Le champignon se conserve à l'état de mycélium latent et les spores semblent n'avoir qu'une faible longévité, c'est une maladie externe qui ne nécessite pas de blessure préalable. La lutte consiste d'abord à entretenir les palmeraies et les palmiers (après destruction par le feu des inflorescences atteintes) et au traitement des palmiers à l'aide de divers fongicides. Il semble que certaines variétés soient plus sensibles au Khamedj que d'autres (Bounaga et Djebri, 2009).

#### 7-2) La pourriture du Coeur à *Thielaviopsis*

Le dessèchement noir des palmes, appelée aussi Mejnoun (palmier fou). A été observé dans différentes régions du Maghreb, en Mauritanie, en Egypte, en Arabie Saoudite, en Irak, aux Emirats et à Bahrein ainsi qu'aux Etats-Unis. Sans être très important, il peut être grave et entraîne la mort des sujets atteints.

Certaines variétés seraient très sensibles. L'agent causal : est la forme imparfaite *Thielaviopsis paradoxa* (Des seynes) Sacc. Le champignon peut envahir aussi bien les parties aériennes que les racines du dattier causant le dessèchement noir des feuilles, la pourriture des inflorescences, la pourriture du cœur et du stipe,

la pourriture du bourgeon terminal. Les moyens de lutte consistent à détruire les feuilles et les inflorescences malades puis à traiter avec un fongicide (dichlone, thirame, bouillie bordelaise) (Bounaga et Djerbi, 2009).

### 7-3) La pourriture du bourgeon ou Belâat

Ce terme signifie « étouffement », elle est due à *Phytophthora* sp, c'est une maladie peu fréquente, elle est signalée en Algérie pour la première fois par Maire et Malençon en (1933). Elle est souvent liée à de mauvaises conditions de drainage. Elle est due à un Phycomycète, à thalle siphonné de l'ordre des Péronosporales. La maladie se caractérise par un blanchissement des palmes du cœur et par une pourriture humide à progression rapide. Elle est généralement mortelle. Comme moyens de lutte (Bounaga et Djerbi, 2009) recommande le drainage, la destruction par le feu des sujets malades. Curativement, les traitements cupriques et le manèbe ont donné des résultats intéressants.

### 7-4) Maladies à dépérissement « Lethal Yellowing »

Cette maladie est déjà signalée depuis quelques années, elle provoque une brûlure des feuilles qui se recroquevillent et se dessèchent et des déformations, elle semble se développer de façon plus ou moins épidémique en Tunisie et en Algérie. Elle est actuellement en cours d'études. Elle ne semble due ni, à un champignon, ni à une bactérie (Bounaga et Djerbi, 2009). Il est nommé maladie des feuilles cassantes (Takrouni *et al*, 1988). Ils parlent aussi d'une maladie causant un dessèchement apical. La vérification de leur nature est en cours. D'autres maladies à *Diplodia* (taches brunes), *Omphalia* (sur racines), *Graphiola* ont été signalées, mais elles sont peu importantes ; jusqu'à présent pratiquement aucune de ces maladies ne présentant de caractère épidémique.

### 7-5) Le Bayoud ou Trachémycose du palmier

C'est la plus grave des maladies du palmier dattier, et elle menace véritablement tous les pays producteurs de dattes. Elle existe au Maghreb, au Maroc, et en Algérie. Elle semble être apparue durant le siècle dernier dans la vallée du Drâa et s'est répandue vers l'ouest et l'est en suivant les cordons du palmier.

(Derjbi, 1988) reprend l'historique très complet de son développement au Maroc et en Algérie. Elle semble être localisée uniquement dans ces deux pays. Elle a ravagé les palmeraies marocaines : 10 à 12 millions d'arbres ont été détruits en un siècle et deux des variétés commercialisées ont pratiquement disparu. En Algérie elle

aurait décimé 3 millions d'arbres, et la variété la plus sensible à cette maladie est Deglet Nour.

Elle a suivi un axe Nord-Sud dans les palmeraies de l'ouest du pays, et elle continue à progresser vers le centre, puisque Metlili, en (1950), et Ghardaïa, en (1978), en sont atteintes. Les prospections réalisées ces dernières années par des équipes de chercheurs (Brac de la Perrière et Benkhelifa, 1988) montrent que dans les oasis non bayoudées de l'ouest, la maladie progresse. Les oasis signalées comme saines par (Brochard *et al*, 1970) ne le sont plus.

Les symptômes externes sont connus sur un arbre à l'origine sain, une palme de la couronne moyenne se dessèche et blanchit d'où le nom arabe dérivant d'Abiod qui signifie Blanc ; les folioles se dessèchent de bas en haut et se replient vers le rachis. La palme prend l'aspect caractéristique d'une plume mouillée. Les palmes voisines sont atteintes à leurs tours et la totalité du bourgeon terminal finit par se dessécher, entraînant la mort de l'arbre, dans des délais qui peuvent varier de quelques semaines à plusieurs mois.

L'agent responsable est le *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*, champignon imparfait. Il se trouve dans le sol et fait partie de la mycoflore. Il pénètre dans la plante et migre dans les vaisseaux libéro-ligneux. Il se maintient très longtemps dans les palmiers Bayoudés, même morts. IL n'y a pas de traitement curatif (Bounaga et Djerbi, 2009).

### 8) L'agent pathogène *Fusarium oxysporum*

#### 8-1) Taxonomie

Parmi les champignons agents de maladies vasculaires, ceux appartenant au genre *Fusarium* sont les plus fréquents et les plus dommageables pour les cultures (Nelson *et al*, 1981). Depuis la description du genre *Fusarium* par Link en (1809), de nombreux travaux ont été consacrés à la taxonomie de ce champignon (Booth, 1971 et Booth, 1977). Selon la classification de Wollenweber et Reinking (1935) (in Nelson *et al*, 1983), le genre *Fusarium* est subdivisé en 16 sections regroupées en 9 espèces phytopathogènes. Le *Fusarium oxysporum* est l'espèce qui comporte les formes phytopathogènes les plus fréquentes et les plus importantes de la microflore fongique des sols cultivés (Messiaen et Cassini, 1968), puisqu'elle représente 80 à 90% de la flore *Fusarienne* totale du Rhizosphère (Correll *et al*, 1986 a et Correll *et al*, 1986 b).

Elle se distingue des autres espèces de *Fusarium* par la production de microconidies, rassemblées en fausse tête à partir de monophialides courtes (Burgess et Lidell, 1983). Seule la reproduction asexuée est connue chez cette espèce, ce qui la place dans le groupe des Deutéromycètes (champignons imparfaits).

En fait, *Fusarium oxysporum* est un des Deutéromycètes telluriques appartenant à la sous-classe des Hyphomycetes et à la famille des Tuberculariaceae (Assigbetse, 1993). *Fusarium oxysporum* comporte un ensemble de formes morphologiquement identiques, mais présentant des spécificités parasitaires parfois très étroites.

Actuellement, on compte environ 80 formes spécialisées, chacune inféodée à une plante hôte particulière (Armstrong et Armstrong, 1981), parmi lesquelles la forme spéciale *albedinis* responsable de la fusariose vasculaire du Palmier dattier connue localement par le « Bayoud ». Position systématique

Classe	.....	Deuteromycetes
Ordre	.....	Moniliales
Famille	.....	Tuberculariaceae
Genre	.....	<i>Fusarium</i>
Espèce	.....	<i>oxysporum</i>

### 8-2) Caractères physiologiques

Ce champignon se développe bien sur un milieu gélosé à base de pomme de terre - Potato Dextrose Agar - (P.D.A) (Bouhot et Billotte, 1964). La croissance débute à 7°C et demeure faible jusqu'à 12°C, devient rapide entre 21°C – 27,5°C et s'arrête à 37°C (Malençon, 1947). L'optimum de croissance du champignon *in vitro* est obtenu à 28°C et la meilleure germination de microconidies est à 27°C (Bounaga, 1975). Cet auteur montre que la croissance est faible entre les pH 8,5 et 9,7 ; rapide pour les pH 5 à 6. Les sources de carbone les mieux métabolisées par ce champignon sont : la pectine, le mannose et le glucose. Les sources d'azote organique sont les mieux utilisées que l'azote minéral (Arib, 1998).

### **8-3) Caractéristiques morphologiques**

Le *Fusarium oxysporum* est un champignon imparfait avec un mycélium aérien est généralement blanchâtre ou rosâtre. Il peut prendre d'autres pigmentations (violette, mauve, orange ou beige) qui sont dues à la formation d'une multitude de spores en surface par des orages fructifères (sporodochies, pionnotes), ainsi qu'aux variations de la lumière et du milieu de culture (Messaoudi *et al*, 1989).

### **8-4) Variabilité de la morphologie**

Chez *Fusarium oxysporum*, la morphologie du thalle est sujette à de fortes variations. La variabilité dans la morphologie mycélienne est un phénomène commun chez les formes spécialisées de *Fusarium oxysporum* (Burgess *et al*, 1989). Les variations portent sur des caractères culturels (aspect du mycélium aérien, pigmentation du thalle et du milieu), sur les caractéristiques biométriques, sur des spores (taille, forme, cloisonnement, etc....), sur des organes fructifères qui leur donnent éventuellement naissance (sporodochies et pionnotes), et enfin, sur la présence ou l'absence de sclérotés (Henni *et al*, 1994). Elles créent des difficultés de maintien en culture du phénotype sauvage des isolats. Ces variations apparaissent mêmes au sein des descendants par conidies d'un même clone (Assigbetse, 1993).

Les variations culturelles chez les formes spécialisées de *Fusarium oxysporum* ont conduit (Booth, 1971 ; Nelson *et al*, 1983) à distinguer des morphotypes différents fondés sur leurs aspects.

Ces morphotypes peuvent évoluer d'un type à l'autre chez toutes les formes spécialisées de *Fusarium oxysporum* (Nelson *et al*, 1981 ; Assigbetse, 1989). Ces auteurs ont ainsi observé des reversions notamment du type sporodochial vers le type pionnotal duveteux ou ras et vice versa. Selon (Follin et Laville, 1966), le morphotype pionnotal peut aussi reverser vers le morphotype sporodochial après un seul passage sur l'hôte.

En outre, pour ces auteurs, le type ras muqueux constituerait l'étape de sénescence des cultures et, par conséquent, la fin de leur évolution morphologique. Les différents types morphologiques observés chez *Fusarium oxysporum* sont notés sur le **Tableau 02**.

**8-5) Formes de reproduction**

Le *Fusarium oxysporum* fait partie du groupe des champignons imparfaits chez lesquels la phase sexuée n'existe pas ou, du moins, n'a jamais été observée. Ce champignon ne se multiplie donc que par voie végétative ou par l'intermédiaire de spores asexuées, conduisant à des descendances de types clonal (Assigbetse, 1993). Cette espèce produit trois types de spores asexuées :

Les microconidies sont sphériques ou allongées, légèrement courbées, unicellulaires généralement, hyalines, 3-15 x 3-5 µm; elles sont produites par des microphialides, enflées à la base et pointues à l'extrémité (Djerbi, 1983).

Les macroconidies falciformes, souvent triseptées, 20-35 x 3-5 µm. Elles sont allongées, plus ou moins arquées, amincies aux deux extrémités, se présentent sous forme de fuseau cloisonné transversalement. Elles sont produites par des conidiophores (monophialides) ramifiés en sporodochies ou par le mycélium aérien. Dans les sporodochies, les macroconidies ont une forme typique et une taille uniforme. Sur le mycélium aérien, elles sont produites indifféremment par des monophialides ou des polyphialides et sont alors de forme et de taille très variables (Assigbetse, 1993).

**Tableau 02** : Les différents morphotypes observés chez *Fusarium oxysporum*

Henni *et al*, (1994).

<b>Morphotype</b>	<b>Caractéristiques</b>
Type sporodochial	Caractérisé par la présence de macrosporodochies massives, disposées plus ou moins en grand nombre dans un mycélium aérien assez court mais dense et d'aspect duveteux.
Type Sclerotal	Le même aspect que le type précédant mais les sporodochies sont remplacées par les sclérotés plus ou moins volumineux d'une pigmentation beige violacé à rosâtre.
Type pionnotal	Présente un aspect luisant et humide ou crémeux, sans mycélium aérien. La couche superficielle est constituée de nombreuses microconidies. Les macroconidies sont formées en nappes sur

	phialides non ramifiées.
Type duveteux	Présente un mycélium aérien assez court mais dense, portant de nombreuses microconidies. Les macroconidies et les Chlamydozoospores se forment tardivement.
Type cotonneux	Présente un mycélium aérien très abondant, épais et très peu sporifié.
Type muqueux	Ne présente pas un mycélium aérien. Les microconidies sont abondantes, les macroconidies rares et les Chlamydozoospores abondantes, mais tardives.
Type Ras Sénescent	Il est caractérisé par un mycélium aérien extrêmement ras, clairseme. Peu visqueux et par une vitesse de croissance très faible.

Les chlamydozoospores intercalaires ou terminales, sphériques, isolées ou en groupes de 2-3. Connues pour être des structures de résistance entourées d'une paroi épaisse parfois ornementée. De forme ovale, elles résultent de la condensation du contenu des hyphes ou des macroconidies (Nelson, 1981).

Les sclérotés rares, bleu sombre à noir, 1-2 mm de diamètre, soit distribués sur la surface mycélienne, soit groupés.

Des échanges de matériel génétique entre individus peuvent néanmoins se produire au cours du phénomène biologique connu sous le terme de « parasexualité ». Pour que de tels échanges puissent se produire, il faut que les filaments mycéliens de deux individus puissent s'anastomoser conduisant à la fusion de deux cellules et à la formation d'une cellule hétérocaryotique (généralement dicaryotique) rassemblant les noyaux (haploïdes) des deux cellules initiales. Il peut alors se produire des recombinaisons mitotiques entre fragments de chromosomes des deux noyaux. Lorsque les hyphes de deux individus sont capables de s'anastomoser, on dit que ces individus sont végétativement compatibles. Il convient de noter que chez les *Fusarium* la compatibilité végétative est sous contrôle de 8 à 10 gènes et que toute altération de l'un d'entre eux conduit à la suppression de la

compatibilité. La recherche de l'existence de la compatibilité végétative entre souches présente donc un double intérêt : d'une part elle permet de déterminer l'existence d'un brassage potentiel de gènes, problème lié à l'évolution des populations, d'autre part, elle constitue un indice d'une certaine proximité génétique entre souches (Assigbetse, 1993).

### 8-6) Cycle de vie

Le cycle de vie de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* est représenté en deux phases : colonisation et parasitisme (Lemanceau et Alabouvette, 1993). Le *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* peut survivre dans le sol et sur des débris végétaux pendant plusieurs années en l'absence et en présence de son hôte. C'est un parasite tellurique qui persiste pendant l'hiver sous la forme de chlamydospores dans les tissus de palmiers malades (racines, rachis, etc.). La désintégration de ces tissus permet la libération des chlamydospores dans le sol où elles demeurent à l'état dormant. Il peut aussi survivre dans les porteurs sains tels que le henné, la luzerne ou le trèfle (Djerbi, 1983). Ce champignon est très inégalement réparti dans le sol, on le trouve entre 0 et 30 cm de la surface du sol, mais parfois jusqu'à 1 m, les chlamydospores sont peu nombreuses et peuvent demeurer dans le sol pendant plus de 8 ans, même si les palmiers sont morts depuis (Tantaoui, 1989). Un petit nombre de propagules suffit pour initier la maladie et quelques racines infectées peuvent provoquer la mort de l'arbre (Djerbi, 1983).

L'irrigation favorise aussi le développement de la maladie, mais on n'en connaît pas les mécanismes précis (plus grande diffusion du champignon dans le sol et/ou des spores dans les vaisseaux) (Fernandez *et al*, 1995). Le *Fusarium oxysporum* démarre son cycle de développement en affectant le système souterrain de l'hôte (racines) avant de devenir systémique dans les tissus conducteurs. Ensuite son développement est lié aux modalités d'interaction entre la variété hôte et la race de l'agent pathogène (Mourichon, 2003).

En contact avec l'hôte et dès que les conditions sont favorables, et dans le cas d'une interaction compatible d'une race sensible, les chlamydospores s'adhèrent, germent et pénètrent dans les tissus vasculaires des racines, à partir desquels le mycélium atteint la tige et se ramifie au niveau des cellules épidermiques (Djerbi, 1983). Les mécanismes précis du dépérissement de l'arbre ne sont pas connus mais, comme pour toutes les fusarioses vasculaires, la mort de la plante résulte

probablement de l'effet combiné des armes chimiques déployées par le parasite, enzymes pectinolytiques et cellulolytiques qui dégradent les parois cellulaires de l'hôte, et des réactions de défense de la plante (Fernandez *et al*, 1995 ; Horsfall et Dimond, 1960).

Arrivé au niveau du cylindre central, le parasite s'installe dans les vaisseaux du xylème (tissu conducteur) et le mycélium produit des microconidies qui sont transportées vers le haut par la sève montante. Quand ce mouvement est empêché par une paroi transversale, les microconidies germent, le tube germinatif pénètre dans la paroi et la formation de microconidies reprend de l'autre côté de la paroi. La mort de l'arbre intervient quand le champignon atteint avec ses toxines le bourgeon terminal.

Au cours de sa progression, *F. o. albedinis* s'échappe du xylème et colonise le parenchyme environnant par un mycélium inter et intracellulaire, c'est ce qui donne plus tard la coloration brun rougeâtre caractéristique des arbres malades. Après la mort de l'arbre, le mycélium continue à se développer dans les tissus morts et forme de nombreuses chlamydospores dans les cellules du sclérenchyme (Louvet, 1977 ; Gaüman, 1957). A l'extérieur, se forment des organes fructifères à la surface des feuilles appelées sporodochies et développent des macroconidies qui à leur tour contaminent d'autres plantes, lorsqu'elles sont transportées par le vent, l'érosion ou bien par les insectes (Jones et Woltz, 1981).

Dans un hôte résistant, cette progression est stoppée dans les cribles au niveau desquels on observe des tyloses obturantes. Les modalités et intensités de réaction de l'hôte sont variables selon les variétés. Généralement, dans le cas d'une résistance marquée on observe une rapide mise en place des réactions de défense qui se traduisent par un blocage de la colonisation systémique des vaisseaux du xylème (Mourichon, 2003). Le dessèchement de la plante résulte donc du blocage de la circulation de sève, conséquence des différentes altérations du système vasculaire (Tantaoui *et al*, 1996).

En général, les conditions favorables à une croissance rapide du palmier-dattier favorisent aussi le développement de la maladie. La température de croissance optimale du pathogène est entre 21 et 27,5°C ; la croissance reste importante à 18°C et à 32°C, mais s'arrête à 7°C et à 37°C (Bounaga, 1975). (**Figure 02**).

Clicours.COM

**9) Pathologie de la fusariose vasculaire**

Lorsque la forme spécialisée *albedinis* du *Fusarium oxysporum* infecte son hôte particulier qui est le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), son action parasitaire se montre catastrophique. La maladie est une trachéomycose. Elle entraîne une perte d'eau et de métabolites nécessaires à la survie des cellules végétales, détruisant ainsi les constituants essentiels des cellules. La Fusariose vasculaire provoque dessèchement et flétrissement progressif suivi d'un jaunissement des feuilles. Enfin la plante fane complètement et meurt (Agrios, 2005). La plante à son tour tente de limiter l'extension du parasite, en édifiant autour de la zone infectée des barrages qui arrêteront la progression du champignon, du moins partiellement. Les vaisseaux sont comblés par des thylls ou des dépôts gommeux : bouchons produits par des cellules du parenchyme (Tantaoui *et al*, 1996). Les cellules se nécrosent autour des hyphes, pour isoler le parasite au sein des tissus morts (Dixon, 1981). Selon certaines théories, la Fusariose est due à la sécrétion de toxines telles que Lycomarasmine et l'acide fusarique (Salama et Mishricky, 1987).

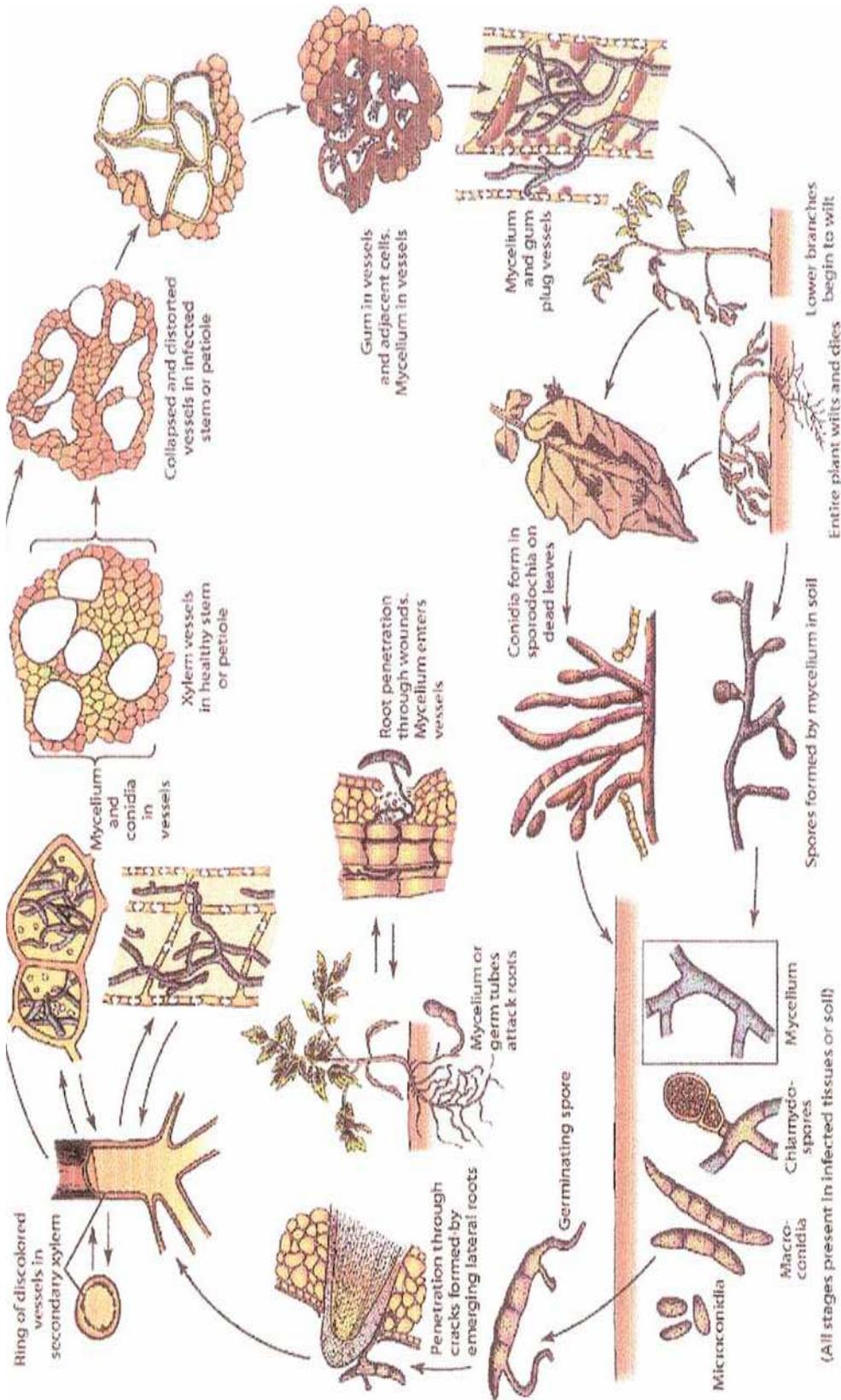


Figure 02 : Cycle infectieux du *Fusarium oxysporum* (Agrios, 2005).

## **10) Symptômes**

### **10-1) Symptômes externes**

Le bayoud attaque aussi bien les palmiers jeunes qu'adultes, de même que leurs rejets basaux. Les premiers symptômes externes de la maladie, visibles par un oeil averti, font leur apparition sur une ou plusieurs feuilles de la couronne moyenne. Les feuilles affectées prennent une teinte plombée (gris cendré) et ensuite se fanent d'une façon particulière: les pennes situées d'un côté de la feuille commencent à blanchir, et la maladie progresse de la base vers l'apex. Quand tout ce côté a été affecté, le flétrissement commence de l'autre côté, en sens inverse cette fois-ci, de l'extrémité de la feuille vers sa base, jusqu'à la mort de la feuille (Djerbi, 1983).

Au cours de ce processus de décoloration et dépérissement des pennes, une coloration brune qui se manifeste dans le sens de la longueur, sur le côté dorsal du rachis, avance de la base vers l'apex de la fronde: elle correspond au passage du mycélium dans les faisceaux vasculaires du rachis. Ensuite, la feuille va prendre une forme arquée, similaire à une feuille humide, et pend le long du tronc. Ce processus peut durer de quelques jours à plusieurs semaines (Djerbi, 1983).

Les mêmes symptômes peuvent ensuite apparaître sur des feuilles adjacentes ou opposées. Dans tous les cas, la maladie avance toujours vers le cœur de l'arbre et l'arbre meurt quand le mycélium atteint le bourgeon terminal. Finalement, les rejets à la base de l'arbre sont attaqués (Djerbi, 1983).

Les symptômes se développent parfois de façon différente. La coloration brune apparaît au milieu du rachis, côté dorsal, et progresse vers le haut jusqu'à ce que le rachis devienne si étroit que tous les tissus sont affectés, ce qui provoque le dépérissement de l'apex. Le flétrissement et la mort des pennes se poursuivent ensuite vers le bas jusqu'à la mort des feuilles. Les symptômes précoces peuvent aussi être différents, on détecte parfois un jaunissement généralisé avant l'apparition des symptômes typiques, surtout en hiver et en automne (Djerbi, 1983).

### **10-2) Symptômes internes**

Si on déracine un palmier malade, on ne voit qu'un petit nombre de racines malades, rougeâtres, sans proportion avec les dégâts observés sur l'arbre. Ces racines malades correspondent à plusieurs groupes de faisceaux vasculaires du stipe qui ont pris une coloration brun rougeâtre, de même que le parenchyme et le sclérenchyme

environnants d'ailleurs. Vers la base du stipe, les taches sont larges et nombreuses. Au cours de leur ascension dans l'arbre, les faisceaux vasculaires colorés se séparent et leurs chemins tortueux, à l'intérieur des tissus sains, peuvent être suivis.

Les frondes qui manifestent des symptômes externes ont une couleur brun rougeâtre et des faisceaux vasculaires très colorés quand on les coupe. Il y a donc continuité des symptômes vasculaires qui existent depuis les racines jusqu'aux feuilles apicales du palmier (Djerbi, 1983). On n'a jamais signalé de symptômes sur pédoncules, fleurs ou fruits (Koulla et Saaidi, 1985).

### 10-3) Variabilité du pouvoir pathogène

L'étude du pouvoir pathogène au sein de l'espèce du *Fusarium oxysporum* a conduit à la définition de formes spécialisées inféodées à chacune d'une plante hôte unique (Henni, 1998).

Plus de 70 formes spécialisées ont ainsi été décrites (Messiaen et Cassini, 1968). L'évolution du pouvoir pathogène du *Fusarium oxysporum* a également été étudiée par mutagenèse artificielle à la nitrosoguanidine. Il est ainsi apparu qu'elle peut provoquer des changements de race correspondant à un gain ou à une perte de virulence (Bouhot, 1981).

Il est généralement admis que le pouvoir pathogène du *Fusarium oxysporum* diminue après une longue période de culture et qu'il n'est pas toujours récupéré après un passage sur l'hôte (Armstrong *et al*, 1940).

Cependant certaines études ont démontré une stabilité du pouvoir pathogène au cours du vieillissement des cultures (Messiaen et Cassini, 1968). L'étude de plusieurs souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, isolées de différents niveaux dans le palmier, a montré que le pouvoir pathogène de ces dernières dépend de la partie d'où elles proviennent.

Les souches provenant de l'extrémité des palmes, possèdent un pouvoir pathogène élevé, en revanche, celles provenant du stipe et des racines ont un pouvoir pathogène faible (Bulit *et al*, 1967).

Donc, plus la souche est pathogène, plus on la rencontre à un niveau élevé sur le palmier. Les souches provenant des porteurs sains (henné, luzerne, trèfle) et du sol sont moins pathogènes que celles isolées du palmier dattier (Arib, 1998).

### **11) Effets des agents pathogènes sur la paroi de l'hôte :**

Les composés pectiques représentent les constituants principaux des parois primaires (lamelle mitoyenne) séparant deux cellules végétales adjacentes et sont également présentes en faible quantité dans les parois secondaires de ces cellules. La dissolution de la paroi primaire entraîne une macération des tissus, et provoque subséquemment des nécroses diverses (Semal, 1986).

### **12) Composants de la paroi cellulaire de l'hôte**

La paroi cellulaire des plantes hôtes joue un rôle nutritionnel au cours de la pathogenèse en représentant une source d'éléments nutritifs pour le parasite et en contrôlant la production des enzymes dégradantes sécrétées par le pathogène (Karr et Albersheim, 1970). La paroi est un complexe de polysaccharides, de glycoprotéines et de lignine. Fonctionnellement, elle est constituée d'une lamelle moyenne, d'une paroi primaire et d'une paroi secondaire. Les principaux polysaccharides constitutifs de la paroi cellulaire sont groupés en pectine, hémicellulose et cellulose (Batman, 1976; Dickison, 2000).

#### **12-1) Cellulose**

La cellulose représente les constituants principaux des polysaccharides de la paroi cellulaire et elle comporte le polymère linéaire extrêmement long de 1.4-d-glucose lié 25000 molécules de glucose.

La cellulose est présente dans des parois primaires (25-30%) et secondaires (avec l'évidence du degré inférieur de polymérisation dans des parois primaires que dans des parois secondaires) dans les microfibrils appelés par structure fortement commandés (analogues à la formation d'une corde épaisse des mentes minces) (Brett et Waldron, 1996). Microfibrils sont des structures stables et leurs cristallisations jouent un rôle important dans la structure de la paroi cellulaire (Dickison, 2000).

## **12-2) Hémicelluloses**

Les hémicelluloses incluent un groupe hétérogène de cellulose comme polysaccharides qui sont variables en composition. Elles changent également considérablement dans la quantité et la complexité dans différents types de cellules et dans différentes espèces de l'hôte (Huisman *et al*, 2000).

Les hémicelluloses incluent le xylane, le mannane, la galactane et l'arabinane. Les hétéropolymères principaux et les principaux monomères actuels dans la plupart des hémicelluloses sont D-xylose, D-mannose, D-galactose, et L-arabinose. Les hémicelluloses sont linéaires, à plat avec un P-l'épine dorsale 1.4 et les chaînes latérales relativement courtes. Le xylane, le polymère principal d'hémicellulose en céréales et bois dur, se compose d'une épine dorsale de D-xylose de P 1,4-linked substituée par différents groupes latéraux tels que l'L-arabinose, le D-galactose, l'acétyl, le feruloyl, le p-coumaroyl, et les résidus acides glucuroniques (Biely, 1985 ; Bastawade, 1992).

## **12-3) Pectine**

Les polysaccharides pectiques sont un autre groupe divers de polysaccharides qui sont particulièrement riches en acide, rhamnose, arabinose et galactose galacturoniques. Ils sont des caractéristiques de la lamelle moyenne et de la paroi primaire de la plante dicotylédones et à un moindre degré de la plante monocotylédones (Brett et Waldron, 1996).

Les polymères principalement de l'acide galacturonique de P -1.4, également connus sous le nom de homogalacturonans, sont particulièrement communs. Les polysaccharides pectiques servent une variété de fonctions déterminant la porosité de la paroi, fournissant la surface de paroi pour l'adhérence de cellules (lamelle moyenne), l'identification de microbe pathogène (Brett et Waldron, 1996 ; Dickson, 2000 ; Dumville et Fry, 2000).

## **13) Principales enzymes de dégradation synthétisées par les parasites**

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases sont un groupe hétérogène d'enzymes qui hydrolysent les substances pectiques et qui sont largement distribuées

dans les plantes supérieures et dans les micro-organismes. Cette famille d'enzymes est capable d'attaquer une variété de liaisons chimiques des pectines. Le terme « enzyme pectinolytique » ne concerne que les enzymes qui agissent sur la partie galacturonique des substances pectiques (**Figure 03**) et les enzymes capables de dégrader les chaînes latérales ne sont pas classées parmi les enzymes pectinolytiques. Les enzymes pectinolytiques sont classées selon la nature du substrat (pectine, acide pectique, oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo) (Favela-Torres *et al*, 2006). Ces enzymes peuvent être divisées en deux grands groupes :

- Les pectinestérases (PE) ou pectine-méthylestérase (PME)
- Les dépolymérase (polygalacturonases et lyases).

### 13-1) La pectine méthylestérase (PME) :

Hydrolyse le *groupe* méthylester, ne coupe pas la chaîne pectique. Le méthanol et l'acide uronique sont les produits de la dégradation.

### 13-2) Pectinestérases (PE) ou pectine-méthylestérases (PME).

Les PE catalysent l'hydrolyse des liaisons esters méthyliques des pectines hautement méthyle, entraînant la libération de méthanol et la formation d'acide polygalacturonique. L'activité de la PE peut être suivie soit par le dosage du méthanol libéré, soit par la détermination de l'augmentation du nombre de carboxyles libres ou encore en utilisant un régulateur de pH. En effet, l'ionisation du groupe carboxyle produit un proton dans le milieu, ce qui cause une variation du pH (Jayani *et al*, 2005).

Les PE hydrolysent seulement les groupes esters adjacents à un groupe carboxyle libre et enlèvent ainsi les groupes méthyles de la chaîne les uns après les autres dans une direction donnée (Sakai *et al*, 1993).

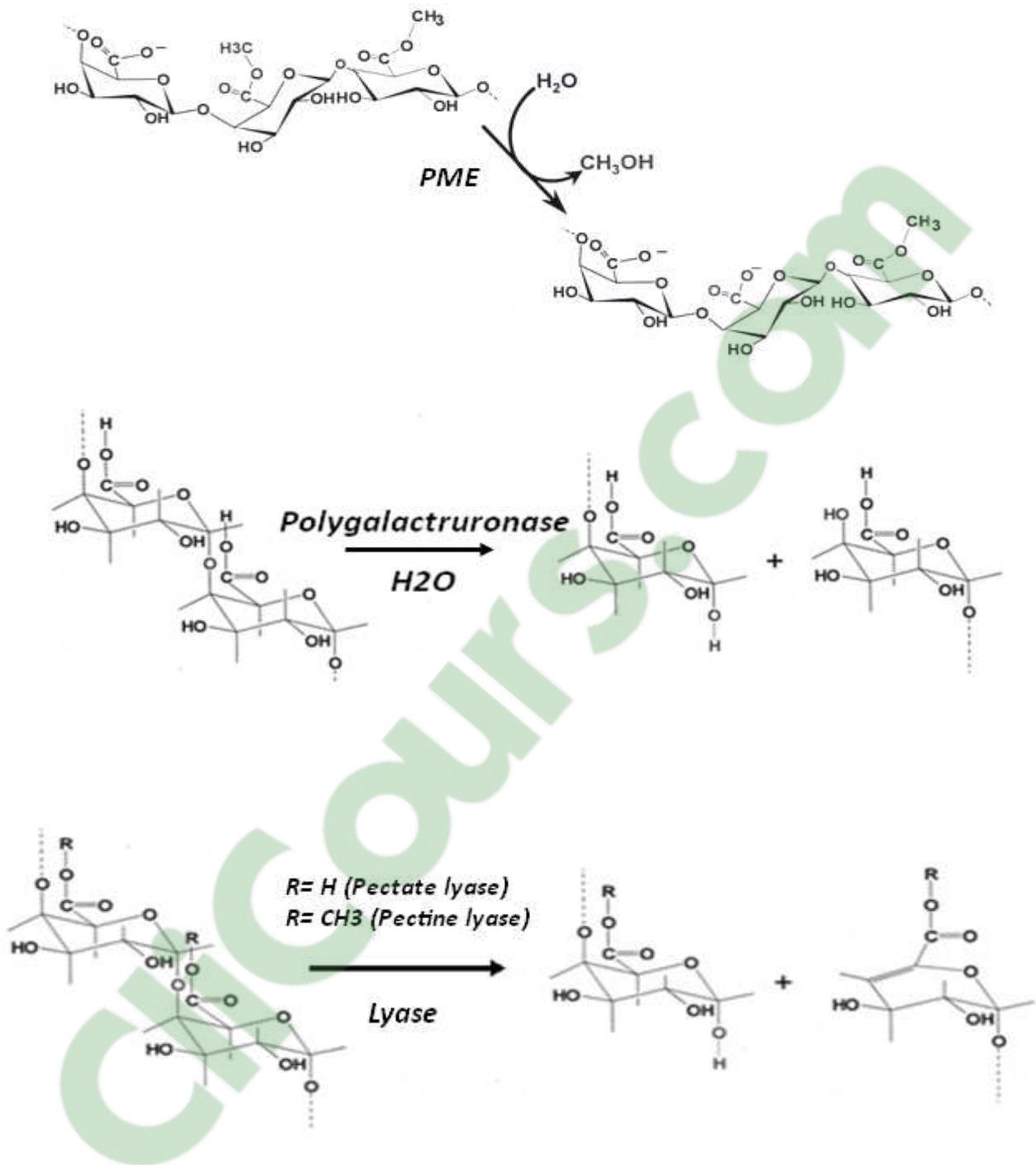


Figure 03 : Mode d'action des pectinases.

Beaucoup de travaux ont été menés sur les propriétés physicochimiques et cinétiques des PE, cependant leur mode d'action n'est toujours pas bien élucidé. Selon (Jayani *et al*, 2005), le mécanisme d'attaque des PE varie en fonction de l'origine. Ainsi, les PE fongiques agissent au hasard suivant un mécanisme « multi-chaine » par lequel l'enzyme forme un complexe enzyme-substrat, se dissocie après la réaction et s'associe à nouveau avec une autre molécule du substrat pour enlever les groupes méthyles.

Un troisième mode d'action a été évoqué : il s'agit d'un mécanisme d'attaque multiple qui est un mécanisme intermédiaire aux deux premiers. Dans ce cas, l'enzyme catalyse la transformation d'un nombre moyen de résidus pour chaque complexe enzyme-substrat formé (Denès *et al*, 2000 ; Cameron *et al*, 2008).

La PE est inhibé par l'augmentation du nombre des carboxyles libres le long des chaînes polygalacturoniques progressivement déméthylées. Cette inhibition est due à la répulsion exercée par la charge négative des carboxyles ionisés. La présence de cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ) pourrait contrecarrer cette inhibition.

Cette inhibition des PE serait également due aux chaînes latérales des sucres neutres dans la molécule de pectine (Sakai *et al*, 1993). Les dépolymérase sont des hydrolases (polygalacturonases et lyases) qui possèdent des activités endo- ou exo-galacturonases. Les dépolymérase peuvent être subdivisées, en fonction du substrat et du mécanisme de clivage des liaisons glycosidiques, en quatre catégories différentes :

- Les polygalacturonases (PG)
- Les polyméthylgalacturonases (PMG)
- Les polygalacturonate lyases (PGL)
- Les polyméthylgalacturonate lyases (PMGL).

Les PG et PMG agissent respectivement sur les pectates et les pectines par un mécanisme d'hydrolyse, tandis que les PGL et PMGL agissent respectivement par  $\beta$ -élimination sur les pectates et les pectines (Alkorta *et al*, 1998). Suivant leur mode d'attaque, la réaction peut se faire soit de manière aléatoire, soit à l'extrémité de la chaîne, ce qui permet de distinguer les endo- et les exo-dépolymérase (Jayani *et al*, 2005).

**13-3) L'hydrolyse: la polygalacturonase (PG) et la pectine méthylgalacturonase (PMG):**

Les PG, sont des enzymes pectinolytiques qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -(1-4) des pectines acides (acide polygalacturonique). Ces enzymes sont spécifiques des substances pectiques non ou partiellement estérifiées par du méthanol. Elles sont les plus étudiées parmi la famille des enzymes pectinolytiques. Les PG impliquées dans l'hydrolyse des substances pectiques sont des endo-PG (EC 3.2.1.15) et des exo-PG (EC 3.2.1.67) (Jayani *et al*, 2005).

Deux méthodes ont été développées pour déterminer l'activité des PG et des PMG. On apprécie cette activité en mesurant la diminution de viscosité ou l'augmentation du pouvoir réducteur du substrat (acide pectique ou pectine). La comparaison des mesures de viscosité et de pouvoir réducteur au cours de la dépolymérisation des pectines et des acides pectiques permet de faire la part des activités « endo » et « exo ». Ainsi, avec une endo-PG la viscosité diminue de moitié quand seulement 2 à 3% des liaisons glycosidiques sont rompues.

Avec une exo-PG, le même abaissement de la viscosité n'est observé qu'après rupture de 20% des liaisons glycosidiques (Sakai *et al*, 1993 ; Jayani *et al*, 2005). Les endo-PG sont produites par divers microorganismes tels que des bactéries, des levures et des champignons.

Elles sont aussi présentes chez certains végétaux et surtout dans les fruits. En général, l'action des endo-PG libère des mono-, di- et tri-acides galacturoniques par un mécanisme d'attaque multiple à chaîne unique ou par un mécanisme d'attaque « multi-chaîne », dans lequel les mono-, di- et trimères s'accumulent seulement après hydrolyse des produits initiaux de dépolymérisation. Pour les pectines hautement méthylées, l'hydrolyse n'a lieu qu'au niveau des résidus d'acide galacturoniques non méthylés. Toutefois, lorsque le degré de méthylation augmente, la vitesse d'hydrolyse de l'enzyme diminue (Sakai *et al*, 1993).

Les exo-PG sont moins fréquentes. Elles sont produites par des champignons et quelques bactéries. On distingue deux types : les exo-PG fongiques avec comme produit final l'acide galacturonique et les exo-PG bactériennes qui produisent principalement l'acide digalacturonique. Les PG isolées des différentes sources microbiennes diffèrent nettement entre elles par leurs propriétés physico-chimiques et leur mode d'action.

Clicours.COM

### 13-4) Les lyases ou transéliminases.

Les lyases dégradent la pectine, les oligomères et les polymères d'acide galacturonique. Ce sont des enzymes qui rompent la liaison glycosidique CO par un mécanisme de  $\beta$ -élimination. Leur action dépolymérisante entraîne la libération d'uronides insaturés et d'oligomères de petite taille. La méthode la plus commode pour suivre l'activité des lyases est la mesure de l'augmentation de l'absorbance à 235 nm due à la double liaison produite à l'extrémité non réductrice des composés insaturés. De plus, les méthodes de détermination de l'activité des PG peuvent également être utilisées pour les lyases. Les lyases sont classées en différents types sur base de leur mode d'action et en fonction du substrat sur lequel elles agissent. Comme pour les PG, selon que la réaction enzymatique se fait au hasard ou à l'extrémité de la chaîne, on distingue les endo- et les exo-lyases.

Les PGL sont produites par plusieurs bactéries et quelques champignons pathogènes, avec les endo-PGL plus abondantes que les exo-PGL. Les PMGL sont produites par *Aspergillus japonicus*, *Penicillium paxilli* et *Pichia pinus*. La plupart des lyases sont d'origine microbienne. Les lyases bactériennes constituent le plus grand groupe d'enzymes pectinolytiques. Les PGL sont activées par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et, dans certains cas, par d'autres ions divalents tels que  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  et  $\text{Sr}^{2+}$ . Elles sont, par contre, inhibées par l'agent chélateur EDTA. Les PMGL sont par contre actives en l'absence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , mais la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  ou celle d'autres cations les stimule. Les PMGL sont les seules dépolymérasas capables de dégrader les pectines hautement méthylée sans action préalable d'autres enzymes (Jayani *et al*, 2005).

### 13-5) Transéliminase pectinolytique (PTE):

La PTE brise la liaison 1,4 et enlève l'hydrogène en 5 (=pectine lyase), coupe donc la chaîne. Les deux principaux mécanismes sont:

- l'hydrolyse, avec coupure du substrat et fixation des fragments sur les constituants de l'eau, par les hydrolases.
- le mécanisme d'élimination par des lyases avec coupure du substrat et formation d'une double liaison en position 4,5.

Les préfixes endo- et exo- signifient respectivement rupture au hasard dans la chaîne et rupture à l'extrémité. Les bactéries et champignons produisant des enzymes pectinolytiques sont nombreux, tant chez les pathogènes que les non

pathogènes. Les enzymes dégradant la cellulose sont classées en quatre catégories, dénommées  $\beta$ -glucosidase (ou cellobiase). La grande chaîne est coupée en plus petites, puis en cellobiose, puis en glucose (Corbaz, 1990).

**Table 03** : Quelques enzymes des agents phytopathogènes dégradant la paroi cellulaire de la plante hôte (Dickson, 2000)

Enzyme	E.C	Auteurs
Arabinofuranosidase	3.2.1.55-Cellulases	Howell, 1975
Endo-1,4- -D-glucanase (carboxynethyl cellulase) cellobiohydrolase $\beta$ -glucosidase	3.2.1.6 3.2.1.91 3.2.1.21	Sheppard <i>et al</i> , 1994 Sposato <i>et al</i> , 1995 Waksman, 1989
Cutinase	3.1.1.74	Yao et Köller, 1994
$\beta$ -galactosidase Endo-1,4-D-glucanase Exo-1,3-D-glucanase	3.2.1.46 3.2.1.39 3.2.1.58	Cooper <i>et al</i> , 1988; Waksman, 1988 Cooper <i>et al</i> , 1988; Wang et Jones, 1995 Schaeffer <i>et al</i> , 1994 Van Hoof <i>et al</i> , 1991 Slomezyuski <i>et al</i> , 1995
Laccase	1.10.3.2-	Gonzales <i>et al</i> , 1992
Acide Polygalacturonique- lyase Endo- polygalacturonase. Exo Polygalacturonase Pectine méthylestérase	Pectinases 4.2.2.2 3.2.1.15 3.2.1.82 3.1.1.11	Walton et Cervone, 1990 Garcia <i>et al</i> , 1997 ; Tans <i>et al</i> , 1998

#### 14) Moyens de lutte

Les plantes, comme tous les organismes vivants, subissent l'action de divers parasites. Ces organismes nuisibles s'attaquent directement aux tissus des plantes, où ils entrent avec eux en concurrence sur le plan des ressources comme l'air, l'eau et les éléments nutritifs du sol (Metcalf et Luckaman, 1994). La protection des plantes peut être divisée selon plusieurs approches. Une protection largement majoritaire des denrées agricoles est produite à l'intérieur de systèmes où la protection des plantes repose sur la lutte.

### 14-1) Lutte génétique

La lutte génétique exploite la diversité phytogénétique afin de cerner la maladie, et peupler les zones dévastées. Cette technique consiste à introduire des gènes de résistance au niveau des plantes appelées : plante transgénique. Ces gènes produisent des protéines susceptibles d'éliminer le parasite.

### 14-2) Lutte culturale

Il est difficile de prévoir l'effet de toute intervention sur un milieu aussi complexe que le sol, et de formuler des règles générales. Généralement, la lutte culturale se résume en deux formules :

1- La répétition de cultures d'un hôte sensible à un parasite tend à faire augmenter le nombre de germes de celui-ci dans le sol.

2- Réciproquement, la culture de plantes non sensibles et l'incorporation de matière organique non colonisable par le parasite permettront la prolifération d'organismes susceptibles de concurrencer le parasite (Messiean *et al*, 1991).

### 14-3) Lutte biologique

Dans un contexte d'agriculture durable, la lutte biologique peut offrir de nombreuses méthodes de lutte alternatives aux pesticides de synthèse (Vincent et Coderre, 1992 ; Hokkanen et Lynche, 1995 ; Jervis et Kidd, 1996).

La variation entre les microorganismes est une caractéristique inhérente et fondamentale des organismes biologiques et constitue une limite importante de la lutte biologique. Ainsi, Lewis *et al*, (1990) mentionnent que la performance des parasites est fréquemment erratique.

Entre autres, cela est lié au comportement de quête de nourriture des parasites qui est fonction de leurs diversités génotypique et phénotypique. Pour la lutte biologique, les bactéries suivantes sont les plus utilisées : *Pseudomonas fluorescens* ou *Pseudomonas putida*, *Erwinia herbicola*, *Bacillus subtilis* et *Enterobacter cloacae*. D'excellents résultats sont obtenus avec *Enterobacter cloacae* et *Erwinia herbicola* aussi bons qu'un traitement avec la metalaxyl à 25 °C, inférieurs à 15 °C. Les performances des divers isolats sont en relation avec la suppression de la

colonisation de la graine par *Pythium* durant les premières 24 heures de sa germination.

Des souches de *Pseudomonas fluorescens* isolées de sol sont actives envers le piétin échaudage (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*). Par enrobage des graines, on obtient une augmentation de rendement due à la diminution des dommages par piétin échaudage. Une lutte biologique à base de *Bacillus subtilis* est aussi possible pour combattre la rouille du haricot, *Uromyces phaseli*, ainsi que pour diminuer la proportion de fruits à noyaux atteints de pourriture après la récolte. Dans le premier cas, des traitements avec une souche de *Bacillus subtilis* se sont révélés aussi efficaces que des applications hebdomadaires de mancozeb.

Dans le second, l'expérience porte sur des pêches, abricots et prunes atteints de moniliose ; le mécanisme d'action serait dû à la présence d'antibiotiques élaborés par la bactérie (Karkachi, 2002). Le bayoud est une épiphytie qui provoque la mort des palmiers. En un siècle, il a détruit plus des deux tiers des palmeraies de dattiers marocains (12 millions d'arbres) et provoque toujours la mort de 4,5 à 12% des palmiers-dattiers (Djerbi, 1983). Le Maroc, qui était un exportateur traditionnel de dattes, en importe désormais.

En Algérie, plus de 3 millions de palmiers sont morts, en particulier à Tidikelt, Touat et M'Zab (Brochard *et al*, 1970 ; Dubost et Kada, 1974). Dans la plupart des oasis, plus de 50% des cultivars commerciaux de dattiers ont été détruits, ceci résulte de la disparition progressive des cultivars de qualité en faveur de cultivars peu productifs. Des oasis à 300-400 palmiers par hectare sont réduits aujourd'hui à 40-50 palmiers par hectare (Saaidi, 1979). La maladie n'a pas seulement provoqué la perte d'un aliment de base pour les populations sahariennes (187 kg par tête par an), mais aussi la perte d'une source de revenus et de devises indispensables.

Elle a réduit considérablement l'étendue des plantes annuelles qui étaient protégées par les palmeraies, et a accéléré le processus de désertification (Djerbi, 1983). De plus, les meilleurs cultivars nord-africains sont les plus sensibles. Le bayoud est une catastrophe pour l'agriculture saharienne marocaine et algérienne (Djerbi, 1983).

#### 14-4) Lutte chimique

Avec l'apparition des pesticides de synthèse, il y environ 50 ans, certains ont imaginé que les ennemis des cultures seraient battus en brèche et éliminés. De toute évidence, cela ne s'est pas produit. Toutefois, l'augmentation de la quantité et

de la qualité des denrées agricoles produites n'est certainement pas étrangère à l'utilisation des pesticides, et les agricultures ayant accès aux pesticides de synthèse sont rarement victimes d'infections dévastatrices (Hislop, 1993).

La découverte et le développement de molécules destinées à combattre les champignons parasites de l'homme et des animaux datent du début du siècle. En effet, Drouhet et Dupont (1988) mentionnent que c'est en 1903 que de Beurmann et Raymond ont préconisé l'utilisation d'iodure de potassium par voie orale dans le cadre du traitement de la sporotrichose. Le triazole et ses dérivés représentent une des classes les plus biologiquement actives des composés, possédant une gamme étendue d'activités. Le noyau de triazole est associé à l'activité pharmacologique divers tel que l'antibactérien, antifongique, hypoglycémique et en agrochimie (Hamoir *et al*, 2001)

Un hétéroatome, est un atome d'une molécule organique différent du carbone ou de l'hydrogène. Les plus fréquents sont l'oxygène, l'azote, le soufre des molécules d'origine biologique. Mais la synthèse utilise fréquemment les halogènes, le phosphore, les métaux, on rencontrera à peu près tous les éléments possibles sauf les plus rares et les plus lourds. Un hétérocycle est une molécule de structure cyclique comportant un ou plusieurs hétéroatomes (Zhang *et al*, 2002).

### 14-4-1) Les dérivés azolés

L'utilisation de cette classe pharmacologique à destination antifongique a pris son essor à partir de 1968. Les dérivés azolés possèdent un noyau :

- soit diazolé comme le kétoconazole
- soit triazolé comme l'itraconazole

Ces différentes molécules modulent la synthèse de l'ergostérol, un stéroïde présent dans la paroi fongique, en interagissant avec une enzyme fongique cytochrome P-450 dépendante. *In fine*, une altération de la perméabilité des membranes cellulaires induit la mort des cellules fongiques sensibles. Les avantages et inconvénients de ces différents dérivés peuvent être des critères importants lors du choix raisonné de telle ou telle molécule (Garanti et Molteni, 2003).

#### **14-4-2) Mode d'action biochimique**

Présents chez presque tous les eucaryotes, les stérols semblent absents des procaryotes. Chez les animaux, le stérol le plus répandu est le cholestérol. Il est rare chez les plantes supérieures, qui contiennent un mélange de stérols alkylés en C<sub>4</sub> parmi lesquels dominent des 24-éthylstérols (sitostérol, stigmastérol).

La biosynthèse de l'ergostérol et les étapes auxquelles interviennent les fongicides qui l'inhibent sont connues. L'un des premiers précurseurs, le mévalonate, est condensé en plusieurs étapes, en squalène. Celui-ci est oxydé en oxy-2,3 squalène par un système enzymatique des microsomes, qui utilise le NADPH comme accepteur d'électrons. On fait l'hypothèse que la cyclisation du squalène, initiée par l'attaque d'un proton sur l'oxygène de l'époxyde, conduit à un carbocation sur la chaîne portée par le cycle D, par un processus concerté ou non. Une série de transpositions qui passent par la migration d'un ion hydrure et deux groupements méthyle, et la perte d'un proton en position 9 conduisent au lanostérol. L'alkénylation en C-24 par la S-adénosyl méthionine conduit au méthylène-24 déhydrolanostérol. Ce dernier s'accumule dans les cellules traitées avec l'un des fongicides ci-dessus. C'est que la déméthylation en position 14, qui conduit normalement au diméthyl-4,4 fécostérol, ne se produit pas. Cette déméthylation fait intervenir un complexe enzymatique comprenant un cytochrome P-450 (Hamoir *et al*, 2001).

#### **15) Les principales enzymes du système antioxydant**

Les enzymes du système antioxydant régulent différentes espèces ayant des réactions d'oxydoréduction (ROS). La superoxyde dismutase (SOD) est chargée de transformer les radicaux superoxydes en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'élimination de ce dernier est alors l'oeuvre d'autres enzymes telles que la catalase et les peroxydases (Monk *et al*, 1989 ; Becana *et al*, 2000; Matamoros *et al*, 2003).

##### **15-1) La superoxyde dismutase**

La superoxyde dismutase est une enzyme omniprésente dans les tissus des organismes consommateurs d'oxygène. Le rôle principal de cette enzyme est de protéger l'organisme des effets destructeurs du radical superoxyde (García-Limones *et al*, 2002) par une réaction de dismutation pour donner le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui est moins

toxique (Bowler *et al*, 1992). Les SOD représentent une famille de métalloenzymes, qui comporte au moins trois formes métalliques selon la nature du métal incorporé dans le groupement prosthétique de l'enzyme (Cu/Zn SOD, Mn SOD et Fe SOD). Comme pour la majorité des enzymes protectrices, l'activité SOD chez une plante est dépendante de son état physiologique et elle varie en réponse aux différentes contraintes biotiques et abiotiques (Gay and Tuzun 2000; Kwon et Anderson 2001; Mhadhbi *et al*, 2004).

### 15-2) La Catalase

La catalase (CAT) décompose l' $H_2O_2$  en eau et en oxygène moléculaire sans besoin de réducteurs et donc peut offrir à la plante un mécanisme de dégradation de  $H_2O_2$  efficace nécessitant un minimum d'énergie. Parallèlement elle entraîne une augmentation du taux d'oxygène (Scandalios *et al*, 1997). Les CAT des plantes supérieures sont des hémoprotéines tétramériques qui existent en multiples isozymes codées par des gènes nucléaires (Scandalios *et al*, 1997); elles interviennent dans divers processus physiologiques: le développement, la défense et la sénescence (Yang et Poovaiah 2002).

L'expression des CAT est affectée par plusieurs facteurs environnementaux tels que la lumière (Willekens *et al*, 1997), l'ozone (Ruzsa *et al*, 1999), la température (Auh et Scandalios 1997), la salinité (Mhadhbi *et al*, 2004) et les blessures (Guan and Scandalios 2000).

Le rôle des CAT dans la défense contre les agents pathogènes a été étudié à l'aide des plantes transgéniques montrant une surexpression ou une diminution de l'expression de cette enzyme (Mittler *et al*, 1999; Dat *et al*, 2001; Vandenabeele *et al*, 2004). La variation de l'activité CAT suite à l'infection dépend du type de parasites (Alcázar *et al*, 1995). On peut les classer en acides, neutres et basiques selon leur point isoélectrique (Quiroga *et al*, 2000).

### 15-3) L'activité ascorbate peroxydase

L'ascorbate peroxydase [APX : EC, 1.11.1.11] qui se caractérise par une grande affinité pour son substrat, l'ascorbate, est une hémoperoxydase de classe I à structure dimérique. Elle est retrouvée dans différents organites de la cellule (Matamoros *et al*, 2003). L'APX utilise l'ascorbate comme accepteur d'électrons pour réduire le peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante:

Le monodéhydroascorbate (MDHA) formé par cette réaction est spontanément transformé en déhydroascorbate (DAsA), ou bien il est réduit en ascorbate sous l'action de la MDAsA réductase en présence de NAD(P)H. Le DAsA est réduit en AsA par la DAsA réductase en présence de glutathion (GSH). Le glutathion est ensuite régénéré par la GSH réductase en présence de NAD(P)H. Cette cascade de réaction forme le cycle ascorbate-glutathion (Asada 1992; Shigeoka *et al*, 2002).

### 1) Isolement et purification :

Nous avons isolé les souches de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* à partir de rachis et de la rhizosphère proche de différentes variétés de palmier dattier présentant les symptômes de Bayoud provenant de différentes oasis d'Adrar, El Mahdia, Timimoune, Beni Abbes et Igli, nous avons utilisé deux méthodes d'isolement :

Nous avons découpé les rachis en petits morceaux environ 3 cm, puis désinfecté avec l'hypochlorite de sodium 2% pendant 3 min et suivi de plusieurs rinçages avec de l'eau distillé stérile. Nous avons déposé trois morceaux dans les boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (Pomme de terre Dextrose Agar) (Annexe 01).

La deuxième méthode d'isolement est réalisée de la manière suivante, nous avons poudré 1gr de sol dans une boîte de Pétri contenant le milieu PDA (additionné de streptomycine et chloramphénicol à raison de 50 ppm) en surfusion, puis nous avons agité délicatement les boîtes jusqu'à solidification du milieu, toutes les boîtes sont incubées à 28 °C à l'obscurité.

Dès l'apparition des filaments mycéliens autour des morceaux ou du grain de sable, nous avons procédé à la recherche des macroconidies par observation microscopique en utilisant une simple coloration au bleu de coton, une fois assuré que nos souches appartiennent au genre *Fusarium*, nous avons recherché des différentes spores microconidies et chlamydospores.

### 2) Culture monospore :

Avant d'entamer des études ultérieures, chaque souche est clonée. Nous avons prélevé un fragment d'environ 1 cm<sup>2</sup> de la marge de la colonie âgée de 7 jours cultivée sur milieu PDA de chaque souche et nous l'avons déposé dans un tube qui contient 5ml d'eau distillée stérile, le tube est agité à l'aide d'un vortex, puis une goutte de la suspension est étalée en stries sur gélose 2% (Annexe 01), après 24 à 48 h d'incubation à 25°C, la recherche de la germination des microconidies est effectué sous la loupe binoculaire, elles sont distinguées des chlamydospores par leur petite taille et l'absence d'épaississement de la paroi, et des macroconidies en germination par l'absence de cloisons. Nous avons repiqué les microconidies germées à l'aide d'une aiguille dans le milieu PDA. Les thalles issus de ces spores constituent les clones. Ces dernies sont conservés en boutures en tube sur PDA au réfrigérateur.

### 3) Test de pouvoir pathogène :

#### 3-1) Préparation du matériel végétal:

Les noyaux de datte sont traités dans plusieurs des bains successifs de 5 min dans l'acide sulfurique 2N, 20 min dans l'alcool à 95°, 20 min dans l'hypochlorite de sodium et 5 min dans l'alcool à 95° suivie de plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile et les noyaux sont mis en germination dans des boites de Pétri contenant de l'eau distillée stérile, les boites sont mises en incubation à 38°C pendant sept jours ensuite la température est baissé à 28°C jusqu'à l'apparition de l'embryon (figure 04), les graines germées sont plantées dans des alvéoles contenant du terreau stérile (figure 05), après l'apparition la feuille cotylédonaire les jeunes plantules sont transférés dans des sachets transparent 5x20 cm contenant du terreau stérile (figure 06) et sont mises dans une serre dans des conditions non contrôlées.

#### 3-2) Préparation de l'inoculum :

Les *Fusarium oxysporum* spp sont très instables en culture, en particulier sur les milieux riches comme PDA. Ils peuvent dégénérer rapidement et (à long-terme) perdre leur pouvoir pathogène. Il est donc nécessaire de cultiver les isolats de *Fusarium oxysporum* sur des milieux peu nutritifs, comme le milieu Synthetic Nutrient-poor Agar (SNA) (Annexe 01), après 10 jours d'incubation, nous avons ajouté 5 ml d'eau distillée stérile aux cultures et à l'aide d'une pipette pasteur coudée nous avons gratté les thalles pour mettre au maximum de spores en suspension, nous avons ajusté l'inoculum à  $10^6$  spores/ml à l'aide d'une cellule Malasses.

#### 3-3) Infection et notation :

L'infection est réalisée sur des plantules âgées de deux mois. Sans les déterrer, nous avons injecté à l'aide d'une seringue dépourvue d'aiguille 10 ml de l'inoculum à  $10^6$  spores/ml dans le fond du sachet où sont groupées des racines jeunes, pour chaque isolat nous avons utilisé 50 plantules qui correspond à un lot, trois lots de plantes témoins qui ont été mis en place sont traitées avec :

- ✓ 10 ml d'eau distillée stérile.
- ✓ 10 ml une suspension de  $10^6$  spore/ml d'un isolat *F. oxysporum* f.sp *ciceri*.

Clicours.COM

✓ 10 ml une suspension de  $10^6$  spore/ml d'un isolat *F. oxysporum* isolé à partir du sol des plantes maraichères dans la région d'Oran.

Nous avons commencé la notation dès que les premiers symptômes sont visibles, le taux de mortalité est enregistré à intervalle régulier pendant 2 mois après le début de l'apparition du premier signe de la maladie, et nous avons arrêtés quand le taux de mortalité provoqué par certains isolats avait atteint 100%. Le test de pouvoir pathogène est valide si la mortalité finale dépasse 20%, et que les plantules témoins ne présentent pas de signe de maladie.

### 3-4) Ré-isolement du champignon :

Le ré-isolement du champignon à partir des plantes testées est réalisé pour confirmer que la mortalité de ces plantes est due à l'isolat inoculé, nous avons suivi le même procédé de l'isolement de *Foa* décrit précédemment.

### 4) L'évaluation de la croissance mycélienne des isolats de *Foa* vis-à-vis de différents sources de carbones :

Pour mieux gérer et maîtriser l'étude des activités pectinolytique, il nous a parût nécessaire de choisir l'isolat qui présente une croissance rapide et importante sur milieu Czapeck solide modifier (Annexe 01) ou la source de carbone saccharose est remplacée par différentes sources de carbone (glucose, pectine de citron et acide polygalacturonique) à raison de 1% séparément, pour cela nous avons déposé un disque de 5 mm de diamètre pris de la marge de chaque isolat âgé de 7 jours au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu Czapeck solide modifier, trois répétitions sont réalisées pour chaque isolat, la mesure des diamètres des colonies est évalué dès que le premier l'isolat a envahi la boîte de Pétri, les résultats sont exprimé en pourcentage de croissance est calculé comme suit :

$$\text{pourcentage de croissance} = \frac{y}{x} \times 100$$

x : diamètre de la colonie obtenu après 10 jours d'incubation avec le substrat testé

y: diamètre de la colonie obtenu après 10 jours d'incubation avec glucose.



**Figure 04** : Prégermination des noyaux des dattes



**Figure 05** : Mise des noyaux des dattes germés en alvéoles



**Figure 06** : Mise des plantules dans des sachets en plastique

### 5) Recherche de l'activité pectinolytique des isolats de *Foa*

Dix isolats de *Foa* qui ont fait l'objet d'étude du test du pouvoir pathogène et l'évaluation de la croissance mycélienne sur milieu Czapeck solide, ont été utilisés pour la recherche de l'activité pectinolytique par dosage colorimétrique, pour cela nous avons cultivé dix isolats de *Foa* dans milieu Czapeck liquide qui contient pectine de citron et glucose à raison de 1% séparément, la filtration est réalisé après 10 jours d'incubation.

#### 5-1) Dosage de l'activité Pectine méthylestérase (PME):

La technique de dosage de l'activité de cette enzyme est basée sur l'augmentation de l'activité due à une déméthylation d'un substrat pectique. Elle s'effectue comme suit, 1 ml de filtrat de culture est ajouté à 5 ml d'une solution pectine de citron 0,5 %, le milieu réactionnel est ajusté à pH 7 avec du NaOH à 0.1 N. Dans l'essai témoin, la préparation enzymatique est portée à 100°C dans un bain-marie pendant 15mn avant d'être ajusté à pH 7. Les filtrats de cultures testés et les témoins sont incubés à 30°C en agitation pendant 3 heures, puis titrés avec du NaOH 0.05 N. Durant le dosage, une homogénéisation constante doit être maintenue. L'activité est exprimée en Unité/mol, où 1 unité correspond au volume de filtrat nécessaire pour obtenir la libération d'un micro-équivalent de H<sup>+</sup> par minute, elle est ensuite rapportée au volume du filtrat de culture. La mesure de l'activité enzymatique des PME est calculée de la manière suivante:

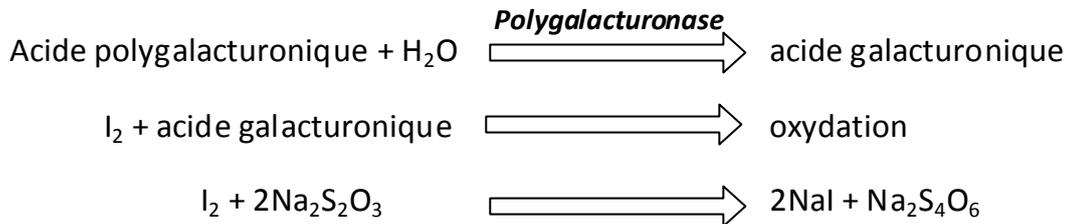
$$\text{Activité en U/mol} = \frac{\text{Volume du NaOH(ml)} \times \text{Normalité du NaOH (N)} \times 10^3}{\text{temps (mn)} \times \text{volume du filtrat (ml)}}$$

#### 5-2) Dosage de l'activité Polygalacturonase PG :

Les polygalacturonases sont des enzymes qui interviennent dans la dépolymérisation des acides pectiques et des pectines très peu méthylées, en produisant des composés à chaînes plus courtes (polyronides et acides galacturonique), présentant un fort pouvoir réducteur:

L'iodométrie est une méthode indirecte de dosage d'oxydoréducteur (aussi appelé dosage en retour). Le couple rédox mis en jeu est I<sub>2</sub>/I<sup>-</sup>. En présence d'un

oxydant, les ions  $I^-$  incolores sont oxydés en  $I_2$  de couleur brune. La réaction se fait comme suit :



La recherche de ce groupe de catalyseurs, est basée sur la mesure des groupements réducteurs qui se forment au dépend d'un acide pectique utilisé comme substrat. Elle s'effectue à 30°C et le milieu expérimental est le suivant :

- 12 ml d'une solution polygalacturonique 0,5% est ajustée au pH 4.
- 3 ml de filtrat de culture ajusté à pH 7.

Après une incubation de 120 mn, des fractions de 5 ml sont prélevées et introduites dans des erlenmeyer.

- Chaque erlenmeyer reçoit 1 ml de carbonate de sodium 1 M et 5 ml d'iodo-ioduré 0,05 M.
- Les erlenmeyer sont déposées pendant 20 mn à l'obscurité, et reçoivent 2 ml d'acide sulfurique 2N avant que le mélange ne soit dosé par thiosulfate de sodium ( $Na_2SO_3$ ) 0,1 N en présence d'empois d'amidon 1 % comme inducteur coloré.

Les activités enzymatiques dans ce cas sont exprimées en micro-équivalent du groupement réducteur apparus dans les conditions expérimentales retenues. Elles sont ensuite ramenées à 100 ml de filtrat de culture.

$$\text{Activité} = \frac{(A)(B)(\text{Témoin ml} - \text{Test ml})(fd)}{t \text{ (mn)} \times \text{vol (ml)} \times \mu\text{eq}}$$

A = 1  $\mu$ mole acide galacturonique oxydé par 1 micro-équivalent de l'iode  $I_2$

B = micro-équivalents of  $S_2O_3$ /ml de la solution thiosulfate de sodium

fd = facteur de dilution

t = temps de réaction en minutes

vol = Volume (millilitre) du filtrat de culture

$\mu\text{eq}$  = micro-équivalents de  $\text{S}_2\text{O}_3$  oxydé par micro-équivalent de  $\text{I}_2$  réduit.

### 6) Etude des différents facteurs influençant sur l'activité pectinolytique :

Nous avons étudié l'activité enzymatique en prenant compte trois facteurs (l'influence du pH, la durée d'incubation et les différents substrats). Le milieu czapeck liquide modifié est réparti dans des erlenmeyers à raison de 50 ml, le pH initial est ajusté à 4, 6 et 8 après l'autoclavage avec du (NaOH ou HCl stériles) à 1 N. Pour chaque substrats et pH nous avons utilisé trente répétitions, chaque erlenmeyer est inoculé avec trois disques de 5 mm de diamètre pris de la marge de l'isolat *Foa* âgé de 7 jours. L'incubation se fait à 25°C avec une agitation à 125 rpm. Le pH du filtrat de culture (solution enzymatique) et le rendement de la biomasse est mesuré chaque jour après filtration pendant 10 jours d'incubation.

#### 6-1) Dosage de l'activité Polygalacturonase PG :

Les polygalacturonases sont des enzymes qui interviennent dans la dépolymérisation des acides pectiques et des pectines très peu méthylées, en produisant des composés à chaînes plus courtes (polyuronides et acides galacturonique), présentant un fort pouvoir réducteur.

La réaction se fait à la température ambiante du laboratoire (25°C) dans un volume final de 2 ml. Pour cela, à 1,5 ml du substrat on ajoute 0,5 ml du filtrat. Les tubes sont incubés pendant 30 minutes à 25°C, la réaction est arrêtée par addition de 2 ml de réactif acide d'inosalicylique (DNS) (Annexe 05). Les tubes sont portés à 100°C durant 5 minutes puis refroidis dans un bain d'eau glacée. Ensuite, on ajoute 4 ml d'eau distillée à chaque tube pour la lecture de la Densité Optique (D.O.) est mesurée au spectrophotomètre (Optisyn) à 540 nm contre le témoin.

L'activité de polygalacturonase est estimée pour chaque solution est exprimée en unité enzymatique par minute. L'unité enzymatique étant la quantité d'enzyme qui libère une micromole de sucres réducteurs par minute (1  $\mu\text{M}/\text{mn}$ ). Une courbe étalon est établie à partir de concentrations variables connues d'acide

galacturonique. A partir de la zone linéaire de cette courbe a été tirée l'équation suivante:

$$y = 6,697 x$$

(où Y = quantité de sucres libérés en  $\mu\text{M.mn}^{-1}$  et x = D.O. déterminée par spectrophotométrie) permettant de calculer la concentration en sucres réducteurs libérés.

### 6-2) Dosage de la pectine lyase :

La technique de dosage de l'activité pectate lyase est basée sur le principe suivant : la pectine est dégradée sous l'action des pectate lyases par  $\beta$ -élimination. Cette réaction libère des composés contenant une double liaison entre C4 et C5 ; cette double liaison et le groupe carboxyle en C5 entraînent une absorbance maximale à 235 nm.

L'activité PL, présente dans les filtrats de culture a été mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 235 nm selon la méthode suivante :

Le mélange réactionnel est constitué de 750  $\mu\text{l}$  de la solution de 0,5% de polypectate de sodium (dissous dans un tampon Tris-HCl 0,1 M à pH = 8,5) et du même volume du filtrat de culture.

Ce mélange réactionnel est ensuite incubé pendant une heure dans un bain thermostatique à 30 °C. On arrête la réaction en plongeant les échantillons dans un bain à 100 °C pendant 20 min.

Après refroidissement, l'absorbance à 235 nm est mesurée dans des cuvettes en quartz. Le témoin est constitué du même échantillon ayant subi une dénaturation préalable (100 °C pendant 10 min). L'activité est exprimée en unité/ $\mu\text{g}$  de protéines. Une unité correspond à la quantité d'enzyme nécessaire à l'augmentation d'absorbance de 0,01 U/min.

### 7) Test de l'activité antifongique des triazoles *in vitro*.

Cette étude est conduite *in vitro*, par des tests de l'action des molécules triazoliques, oxidiazoles et ammonium quaternaire (les structures des molécules et

leurs caractères physico-chimique sont illustrés dans l'annexe 02) testées sur la croissance mycélienne, et leurs influences sur des activités enzymatiques. Dans un premier temps, nous avons préparé des solutions mères de chaque molécule comme suit 0,05 gr de chaque produit est dissoute dans 1 ml de l'acétone pour atteindre une concentration de  $5 \cdot 10^4$  ppm, ensuite des volumes de 20  $\mu$ l, 40  $\mu$ l, 80  $\mu$ l et 160  $\mu$ l de la solution mère sont incorporés dans 20 ml du milieu PDA solide séparément, pour obtenir des concentrations finales de 50, 100, 200 et 400 ppm respectivement, chaque concentration est comparai avec son propre témoin, en ajoutant les mêmes volumes de solvant (sans la molécule) dans milieu PDA, pour évaluer l'unique l'effet des triazoles et oxidiazoles, par contre les ammoniums quaternaires sont des molécules hydrophiles, pour cela nous avons utilisé un seul témoin.

### 7-1) Action des triazoles et oxidiazoles et ammoniums quaternaires sur la croissance mycélienne :

Le test de l'influence de ces molécules sur la croissance mycélienne est réalisé sur l'isolat qui a présenté un taux de pathogénicité élevé et une forte activité pectinolytique, trois répétitions sont réalisées pour chaque concentration, les boîtes sont ensemencées avec une rondelle de 5 mm de diamètre issue de la marge de la colonie âgée de 7 jours, sont incubées à 28°C à l'obscurité. La croissance mycélienne est estimée lorsque le témoin a envahi la boîte de Pétri, en mesurant la moyenne des diamètres perpendiculaires les plus dissemblables de chaque colonie. Le pourcentage d'inhibition (PI) par rapport au témoin est calculé selon la formule suivante :

$$PI = \frac{V_t - V_f}{V_t} \times 100$$

$V_t$ : vitesse de la croissance du champignon dans le milieu de culture sans molécule.

$V_f$ : vitesse de la croissance du champignon dans le milieu de culture à une concentration [c] de la molécule.

De l'équation de régression linéaire entre les logarithmes népériens des concentrations (en abscisses) et les pourcentages d'inhibition de la croissance (en ordonnées), on détermine les concentrations inhibitrices de 50 ( $CI_{50}$ ) et 95% ( $CI_{95}$ ) de la croissance mycélienne.

### 7-2) L'influence des molécules sur les activités enzymatiques :

L'approche de l'influence des triazoles sur les activités enzymatiques est exploité dans ce chapitre, le choix des enzymes est porté sur la superoxyde dismutase et la peroxydase parce qu'elles sont reportées dans plusieurs travaux qui étudient le stress biotique ou abiotique chez les microorganismes, ces enzymes sont recherchées dans les filtrats de cultures par des dosages biochimiques.

#### 7-2-1) Préparation des extraits enzymatiques :

Des rondelles de 5 mm de diamètre prises de la marge de la colonie, sont ensemencées dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml du milieu PDA liquide qui contient différentes concentrations (50, 100, 200 et 400 ppm) de molécules triazoliques séparément, l'incubation est maintenue sous agitation à 125 rpm à 25°C pendant 10 jours. Le filtrat de culture récupéré par filtration, puis réparti dans des tubes à essai à raison de 15 ml, stocké à -20°C, il constituera l'extrait qui servira pour la recherche des activités enzymatiques superoxyde dismutase et peroxydase).

La teneur en protéines de chaque filtrat est appréciée par la méthode de Bradford (1970) au colorimètre à 595 nm (Annexe 04).

#### 7-2-2) Dosage de la peroxydase :

En présence de pyrogallol donneur d'hydrogène, peroxydase convertit  $H_2O_2$  en une molécule  $H_2O$  et libération d'oxygène. L'oxydation du pyrogallol donne la purpurogallin un produit coloré qui peut être suivie par spectrophotomètre à 420 nm. Le mélange réactionnel est constitué de 3 ml de solution pyrogallol et 1 ml de filtrat de culture, ensuite, 0,5 ml de hydroxyde d'hydrogène est ajouté, le changement de l'absorbance est suivi chaque 30 secondes pendant 3 minutes (le protocole est présenté en annexe 06). Une unité de peroxydase est définie comme changement d'absorbance à 420 m est calculé comme suit :

$$\left( \text{Unité/ml} \right)_{\text{enzyme}} = \frac{\frac{\Delta A_{420} \text{ test}}{T} - \frac{\Delta A_{420} \text{ blanc}}{T}}{12} \times 3 \times df$$

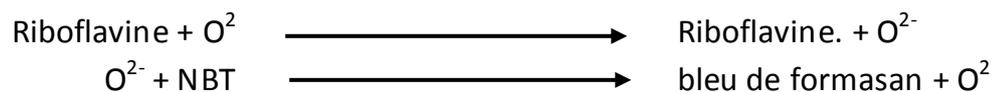
T = temps (seconds) 3 = Volume (in milliliters) of assay

df = Dilution factor 1 = Volume (millilitre) de filtrat de culture utilisé.

12 = coefficient d'extinction de 1 mg/ml de Purpurogallin à 420 nm

### 7-2-3) Détection de l'anion superoxyde

L'évaluation de l'activité SOD est différente. Le milieu réactionnel contient une molécule photo-sensibilisatrice (la riboflavine) qui est une molécule capable d'être réduite par  $O_2^-$  (le nitrobleu de tétrazolium). L'éclairage intense du milieu réactionnel induit l'oxydation de la riboflavine qui cède un électron au dioxygène pour former un anion superoxyde interagissant avec le NBT, incolore, pour former du bleu de formasan (bleu). L'activité de la SOD limite la formation de ce bleu de formasan et est évaluée en pourcentage d'inhibition par rapport à un contrôle dépourvu de SOD.



Les activités sont calculées en  $\mu\text{mol}$  de substrat oxydé ou réduit. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de protéine. L'activité SOD est donnée en unité. $\text{mg}^{-1}$  de protéine, une unité correspondant à la capacité d'inhiber 50 % du formasan formé dans le tube témoin (protocole est présenté en annexe 04). L'activité est calculée selon la formule suivante :

$$\Delta A_{550\text{nm}} / \text{mn} = \frac{A_{550\text{nm}} \text{ at } 5\text{mn } 30\text{s} - A_{550\text{nm}} \text{ at } 30\text{s}}{5\text{mn}}$$

Détermination le taux d'inhibition % pour les filtrats de culture test.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\Delta A_{550\text{nm}} / \text{mn control}) - (\Delta A_{550\text{nm}} / \text{mn test})}{(\Delta A_{550\text{nm}} / \text{mn control})} \times 100$$

**8) Analyse statistiques** de nos résultats sont traité par logiciel XlStat version d'évaluation 2013, et dessin des graphes sont réalisés avec logiciels Curveexpress 1.41

### 8-1) Analyse de variance (ANOVA)

L'analyse de la variance est l'acronyme de « ANalyse Of VAriance) ou « Analyse de variance ». Elle peut être perçue comme généralisation du **test t** à plus de deux groupes. Plus généralement, soient **K** groupes d'observations issus de **K** distributions normales indépendantes de variances identiques, et de moyennes respectives  $\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_k$ . Les groupes n'ont pas besoin d'avoir des effectifs égaux.

L'**ANOVA** va tester l'hypothèse nulle **H0** :  $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$  contre l'hypothèse alternative **H1** : il existe au moins une moyenne différentes des autres.

Comme précédemment, si la valeur de probabilité obtenue de l'**ANOVA** est inférieure au seuil de significativité, l'hypothèse d'égalité des moyennes sera rejetée. Sinon, on conclura que les données ne sont pas incompatibles (à ce niveau de risque) avec l'hypothèse d'égalité des moyennes.

Dans le but de compléter **ANOVA**, nous avons développé un grand nombre de procédures de comparaisons multiples, dits tests « *a posteriori* » ou « *post-hoc* ». Le test de **Newman-Keuls** est l'une de ces procédures.

### 8-2) Test de Newman-Keuls (test de comparaison multiple)

Le test de Newman-Keuls est un test de comparaison de moyennes par paires, pratiqué à l'issue d'une **ANOVA**. Dans le cas du rejet de H0 après l'**ANOVA**, on ne peut conclure que de la façon suivante : « Il existe au moins un groupe parmi les K dont la moyenne diffère significativement des autres au risque consenti près ». Là s'arrêtent les conclusions d'une **ANOVA**, celle-ci ne permettant pas de pousser plus loin l'analyse afin de préciser quel(s) groupe(s) ont une (des) moyenne(s) significativement différentes (s) de celles des autres groupes.

Le test de Newman-Keuls est une des procédures permettant de compléter l'**ANOVA**. Le résultat du test est une série de groupes dont les moyennes sont considérées comme significativement différentes, au niveau de risque choisi (5% dans notre cas).

Clicours.COM

### 8-3) Le coefficient de corrélation de rang de Spearman.

Le coefficient de corrélation de rang (appelé coefficient de Spearman) examine l'existence d'une relation entre le **rang** des observations pour deux caractères X et Y, ce qui permet de détecter l'existence de relations monotones (croissante ou décroissante), quelle que soit leur forme précise (linéaire, exponentiel, puissance, ...).

Ce coefficient est donc très utile lorsque l'analyse du nuage de points révèle une forme curviligne dans une relation qui semble mal s'ajuster à une droite. On notera également qu'il est préférable au coefficient de Pearson lorsque les distributions X et Y sont dissymétriques et/ou comportent des valeurs exceptionnelles.

Le coefficient de Spearman est fondé sur l'étude de la différence des rangs entre les attributs des individus pour les deux caractères X et Y :

$$\rho(X, Y) = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^N [r(X_i) - r(Y_i)]^2}{N^3 - N}$$

$r(X_i)$  : rang de  $X_i$  dans la distribution  $X_1, \dots, X_N$

$r(Y_i)$  : rang de  $Y_i$  dans la distribution  $Y_1, \dots, Y_N$

Ce coefficient varie entre -1 et +1. Son interprétation est la même que celle de Pearson, mais il permet de mettre en évidence des relations non-linéaires lorsqu'elles sont positives ou négatives.

### Significativité d'une relation

Le calcul d'un coefficient de corrélation ne constitue qu'une première étape dans l'analyse de la relation entre deux caractères. Il s'agit tout au plus d'une étape exploratoire qui doit être validée par un **test de la significativité** de la relation et par une **vérification de la validité de la relation** (absence de biais).

#### Test de la significativité d'une relation

Les coefficients de corrélation de Pearson ou de Spearman ne renseignent pas sur le degré de **significativité** d'une relation car celle-ci dépend également du nombre d'observation. Pour déterminer si une relation est significative, il faut procéder à un **test d'hypothèse** en procédant de la façon suivante :

- (1) **H<sub>0</sub> : il n'y a pas de relation entre les deux caractères X et Y**
- (2) **On se fixe un risque d'erreur pour le rejet de H<sub>0</sub> (exemple alpha=5%)**

- (3) On calcule la valeur absolue du coefficient de corrélation  $r(X,Y)$  dans la table correspondante (Pearson ou Spearman)
- (4) On calcule la valeur théorique  $r(\alpha, N.)$  de ce coefficient qui n'est dépassé que dans  $\alpha$  % des cas
- (5) On teste  $H_0$  vraie si  $r(\alpha, ddl) > \text{abs}[ r(X,Y) ]$
- (6) On accepte ou rejette  $H_0$

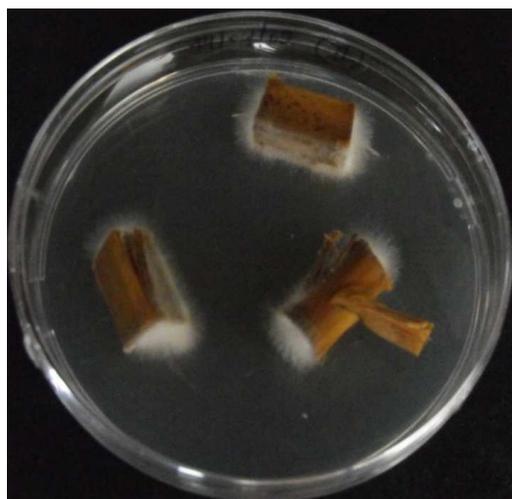
### **1) Résultats de l'isolement des souches de *Fusarium oxysporum f.sp albedinis***

Les isolats qui ont servi pour cette étude ont été isolés à partir des rachis, parce que nous n'avons pas pu isoler *Fusarium oxysporum* à partir du sol, parce que toutes les boîtes de Pétri ont été contaminées par les bactéries et pour *Rhizopus* connu par son mycélium aérien très abondant et son développement rapide qui a envahi rapidement la boîte de Pétri en quelques jours. Dès l'apparition de mycélium à partir des rachis, nous avons procédé à la purification des souches, suivie de culture monospore, qui n'a présenté aucune variation morphologique chez les descendants (figure 07).

En se basant sur l'aspect et la couleur du mycélium, la caractérisation macroscopique a révélé une variabilité morphologique au sein de notre collection

Différents aspects morphologiques de nos isolats ont été observés. Il s'agit du type ras muqueux qui est majoritaire, présente 50%, du type duveteux qui présente 16%, les autres isolats ont un mycélium d'aspect compact et entièrement cotonneux qui présente 33% de la collection (figure 08). Les caractères morphologiques et l'origine d'isolement sont illustrés dans le tableau 04.

L'observation microscopique révèle que les souches isolées produisent trois types de spores (figure 09), les microconidies qui sont unicellulaires ou bicellulaires, globuleuses ou arrondies, elles sont formées sur des monophialides courtes dressées perpendiculaires aux filaments. Les macroconidies qui sont pourvues de 3 à 5 cloisons, rarement plus, leur taille varie considérablement, les chlamydospores, forme de résistance, de couleur hyaline, sont arrondies de position intercalaire. Ces spores sont produites en quantité différente selon le morphotype des souches.



**Figure 07 : Isolement de souche de *Fusarium oxysporum* à partir des rachis**



**Figure 08 : La culture monospore de *Fusarium oxysporum***



**Aspect Cotonneux**

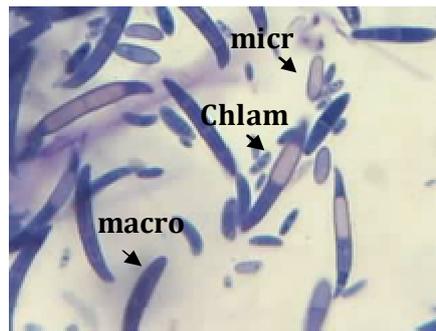


**Aspect duveteux**

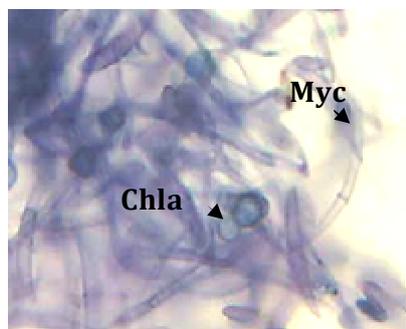


**Aspect ras muqueux**

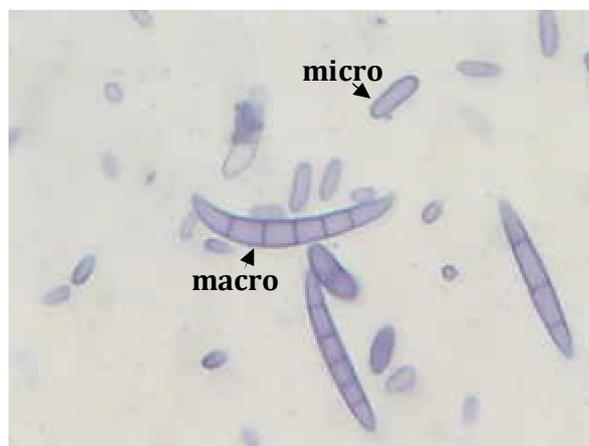
**Figure 09 : Différents aspects morphologiques des isolats de *Fusarium oxysporum***



**formation des chlamydospore sur les macroconidies**



**chlamydospore intercalaire formé sur dans mycélium**



**macroconidies 5 cloisons et microconidie unicellulaire**

**Figure 10 : Observation microscopique de différents types de spores de *Fusarium oxysporum***

**Tableau 04** : Etude des Caractères morphologiques des isolats de *Fusarium oxysporum*.

<b><u>Isolats</u></b>	<b><u>Cultivar</u></b>	<b><u>Site</u></b>	<b><u>Morphotype</u></b>	<b><u>Couleur</u></b>
<b>KN1</b>	<b>Deglet nour</b>	<b>Metlili</b>	<b>Ras muqueux</b>	<b>Blanc</b>
<b>KN2</b>			<b>Duveteux</b>	<b>Blanchâtre</b>
<b>KN3</b>			<b>Duveteux</b>	<b>Blanchâtre</b>
<b>KN4</b>	<b>Ghars</b>		<b>Cotonneux</b>	<b>Blanchâtre</b>
<b>KN5</b>	<b>Outekbala</b>		<b>Duveteux</b>	<b>Blanchâtre</b>
<b>KN6</b>	<b>Tafezouine</b>		<b>cotonneux</b>	<b>Blanche</b>
<b>KN7</b>	<b>Tazerzaïte</b>		<b>Ras muqueux</b>	<b>Saumon</b>
<b>KN8</b>			<b>Ras muqueux</b>	<b>Blanchâtre</b>
<b>KN9</b>			<b>Ras muqueux</b>	<b>Saumon</b>
<b>KN10</b>			<b>Cotonneux</b>	<b>Blanchâtre</b>
<b>KN11</b>	<b>Tazerzaïte</b>	<b>Aderjane</b>	<b>Cotonneux</b>	<b>Blanchâtre</b>
<b>KN12</b>	<b>Timliha</b>	<b>El Mahdia</b>	<b>Ras muqueux</b>	<b>Blanche</b>
<b>KN13</b>	<b>Timliha</b>	<b>Timimoun</b>	<b>Cotonneux</b>	<b>Violet</b>
<b>KN14</b>	<b>Timliha</b>	<b>Igli</b>	<b>Ras muqueux</b>	<b>Blanche</b>
<b>KN15</b>			<b>Cotonneux</b>	<b>Blanche</b>
<b>KN16</b>			<b>Ras muqueux</b>	<b>Blanche</b>

### 2) Pouvoir pathogène des isolats

Les résultats du pouvoir pathogène soient valider lorsque le taux de mortalité des plantules du palmier dattier au stade de 2 feuilles dépasse 20% après un mois de l'inoculation, ce taux constitue le seuil minimal nécessaire pour caractériser d'une manière sûre *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*.

Au cours de nos observations de l'évaluation de nos isolats tests et les témoins utilisées pour ce test, nous n'avons constaté aucun symptôme de flétrissement ou de jaunissement qui caractérise cette fusariose chez les témoins inoculés par *Fusarium oxysporum* f.sp *ciceri*, *Fusarium oxysporum* et l'eau de robinet (figure 11), sauf quelques plantules sont morte.

Le début de la notation hebdomadaire de cette expérience a débuté après quinze jours après l'inoculation et on arrête de prendre note jusqu'à que un isolat tester atteint les 100% du taux de mortalité qui peut durer 30 jours ou plus (figure 12), les nombres des plantules mortes durant quatre semaines et par chaque lot sont présentés dans le tableau 05.

Nous avons remarqué que tous les isolats testés étaient pathogènes, le nombre de plantules détruit est variable selon chaque isolat, nous avons noté que l'isolat KN1 a détruit 49 plantules soit un taux de mortalité est de 99,2% et que l'isolat KN4 a provoqué une mortalité de 20 plantules soit un taux de mortalité égale à 40%. Les données prélevées exprimées en pourcentage de mortalité par isolat et par semaine sont rapportées dans le tableau 06.

Le dépérissement de quelques plantules témoins n'est pas due à l'action du *Fusarium*, peut être, il est relié à d'autres facteurs (stresse biotique ou abiotique), parce que au moment de la vérification que la mortalité des plantules est due à l'action de nos isolats, par le test de réisolement (figure 13), nous n'avons pas isolé les *Fusariums* à partir des plantules témoins.

Le taux de mortalité est varié en fonction du temps ( $p < 0,007$ ) a été significativement à la 5<sup>ème</sup> et 2<sup>ème</sup> semaine et significativement plus important à la 4<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> semaine. La mortalité n'a pas varié significativement pour le facteur lot ( $p = 0,08$ ). Cependant, la mortalité moyenne (22,07 et 17,607) est supérieure pour la 4<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> semaine que (9,793 et 9,583) pour la 5<sup>ème</sup> et 2<sup>ème</sup> semaine, le test de Keuls et Newman a dégagé une distribution de trois groupe selon l'homogénéité significative, le groupe A qui renferme le taux de mortalité 4<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> semaine et groupe B qui est composé de la 5<sup>ème</sup> et 2<sup>ème</sup> semaine (Tableaux 07 et 08).

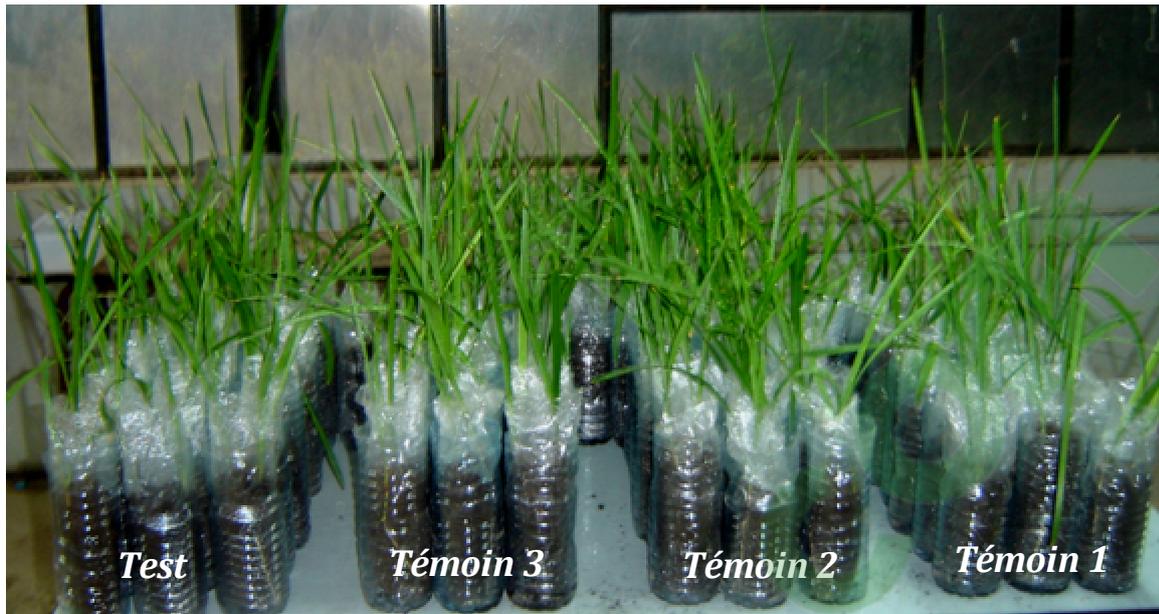


Figure 11 : Les plantules âgées de 2 mois inoculées

- Témoïn 1      Plantes inoculés avec H<sub>2</sub>O
- Témoïn 2      Plantules âgées inoculées avec *Fusarium oxysporum f.sp ciceri*
- Témoïn 3      Plantules âgées inoculées avec *Fusarium oxysporum*
- Test          Plantules âgées inoculées avec un de nos isolats

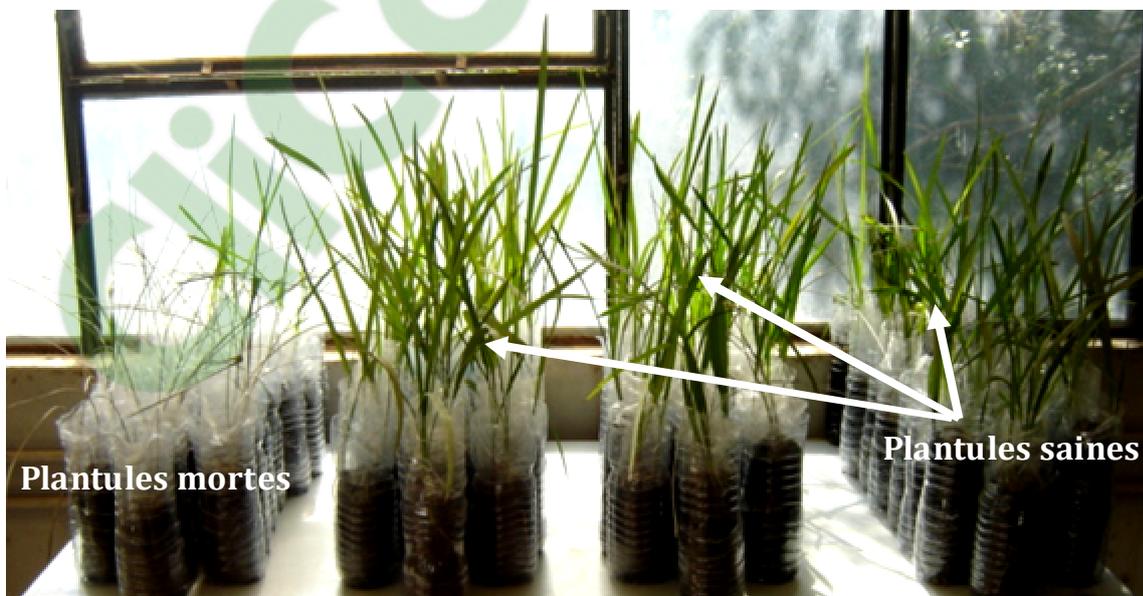


Figure 12 : Résultat du pouvoir pathogène après 1 mois de l'inoculation

L'analyse de la variance montre que le taux de mortalité des 10 isolats inoculés aux plantules de palmier dattier au stade de deux feuilles, sont significativement différentes au seuil de 5%.

Le taux de mortalité est hautement significatif, le test de Newman-Keuls montre que l'isolat KN1 a un taux de mortalité important (Tableau 09), et le taux des deux isolats KN2 et KN3 leurs de taux de mortalité un peut important par rapport à l'isolat KN1, par contre les isolats KN8, KN7 et KN10 présentent un taux de mortalité moyen, alors que les isolats KN9, KN5, KN6 et KN4 présentent un taux de mortalité faible. De ce test statistique, il ressort que les isolats se répartissent en quatre groupes distincts.

Le premier groupe renferme uniquement l'isolat KN, le deuxième groupe est formé des isolats KN2 et KN3, le trois groupe est composé des isolats KN8, KN7 et KN8, enfin le dernier groupe renferme les isolats KN9, KN5, KN6 et KN4.



**Figure 13: Ré-isolement de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* à partir de racine de plantule morte**

**Tableau 05 : Nombre de plantules mortes par semaines et par isolat**

Isolats	semaine				Somme
	2 <sup>ème</sup>	3 <sup>ème</sup>	4 <sup>ème</sup>	5 <sup>ème</sup>	
Témoin (H2O)	0	0	1	1	2
Témoin Foc	1	0	0	1	2
Témoin Fo	1	0	1	1	3
KN1	4	16	25	4	49
KN2	2	16	20	4	42
KN3	5	14	13	4	36
KN4	1	5	6	4	16
KN5	6	8	5	4	23
KN6	5	5	6	4	20
KN7	4	8	9	11	32
KN8	7	14	6	5	32
KN9	7	5	6	2	20
KN10	5	11	11	5	32

**Tableau 06 : Taux de mortalité par semaines et par isolat**

<b>Isolats</b>	<b>semaine</b>				<b>Somme</b>
	<b>2<sup>ème</sup></b>	<b>3<sup>ème</sup></b>	<b>4<sup>ème</sup></b>	<b>5<sup>ème</sup></b>	
<b>KN1</b>	<b>8,0</b>	<b>32,0</b>	<b>51,0</b>	<b>8,2</b>	<b>99,2</b>
<b>KN2</b>	<b>4,0</b>	<b>20,0</b>	<b>40,8</b>	<b>8,2</b>	<b>73,0</b>
<b>KN3</b>	<b>10,0</b>	<b>28,0</b>	<b>26,5</b>	<b>8,2</b>	<b>72,7</b>
<b>KN4</b>	<b>12,0</b>	<b>10,0</b>	<b>10,2</b>	<b>8,2</b>	<b>40,4</b>
<b>KN5</b>	<b>8,0</b>	<b>14,0</b>	<b>10,2</b>	<b>8,2</b>	<b>40,4</b>
<b>KN6</b>	<b>10,0</b>	<b>10,0</b>	<b>12,2</b>	<b>8,2</b>	<b>40,4</b>
<b>KN7</b>	<b>8,0</b>	<b>16,0</b>	<b>18,4</b>	<b>22,4</b>	<b>64,8</b>
<b>KN8</b>	<b>14,0</b>	<b>28,0</b>	<b>12,2</b>	<b>10,2</b>	<b>64,4</b>
<b>KN9</b>	<b>14,0</b>	<b>10,0</b>	<b>12,2</b>	<b>4,2</b>	<b>40,4</b>
<b>KN10</b>	<b>10,0</b>	<b>22,0</b>	<b>22,4</b>	<b>10,2</b>	<b>64,6</b>

**Tableau 07 : Analyse de la variance réalisée sur le taux de mortalité observé pendant quatre semaines**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	3	1451,391	483,797	6,058	0,002
Erreur	36	2875,050	79,862		
Total corrigé	39	4326,441			

**Tableau 08: Analyse de variance et test de Keuls-Newman du taux de mortalité observé pendant quatre semaines. Le taux de mortalité a été estimé après 15 jours de l'inoculation des plantules du palmier dattier chez tous les isolats**

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
semaine 4 vs semaine 2	12,503	3,140	2,693	0,017	Oui
semaine 4 vs semaine5	12,293	3,087	2,445	0,011	Oui
semaine 4 vs semaine 3	4,480	1,125	2,028	0,268	Non
semaine 3 vs semaine 2	8,023	2,015	2,445	0,123	Non
semaine 3 vs semaine5	7,813	1,962	2,028	0,058	Non
semaine5 vs semaine 2	0,210	0,053	2,028	0,958	Non

Test de Keuls –Newman

Modalité	Moyenne	Groupes
semaine 4	22,087	A
semaine 3	17,607	A B
semaine 5	9,793	B
semaine 2	9,583	B

Tableau 09 : Analyse de la variance de l'estimation du taux de mortalité chez tous les isolats *Fusarium oxysporum* f.sp *albdenis*

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	9	11367,650	1263,072	151,581	< 0,0001
Erreur	20	166,653	8,333		
Total corrigé	29	11534,303			

**Test de Keuls-Newman**

Modalité	Moyenne	Groupes			
KN1	99,333	A			
KN2	76,167		B		
KN3	72,233		B		
KN8	63,900			C	
KN7	63,833			C	
KN10	63,833			C	
KN9	38,933				D
KN5	38,833				D
KN6	38,833				D
KN4	38,800				D

### 3) Influence des substrats sur la croissance mycélienne :

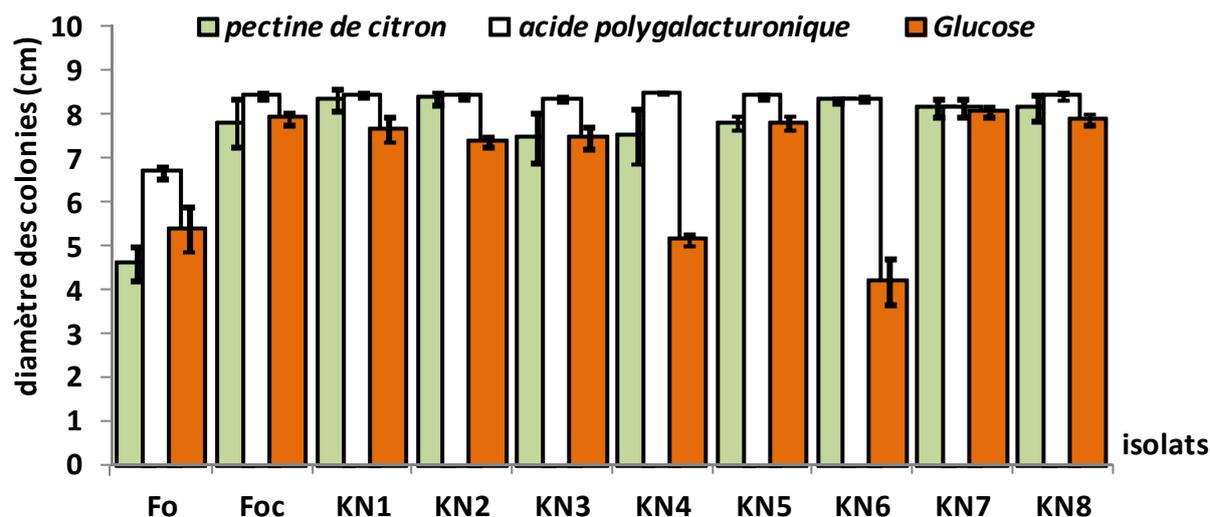
Dans le but de choisir un isolat potentiellement actif pour la recherche de l'activité pectinolytique et de corréliser entre la relation pouvoir pathogène et l'implication de ces enzymes dans l'interaction hôte-parasité, il était nécessaire de confronter les 10 isolats utilisés dans le pouvoir pathogène avec différents substrats et d'évaluer leurs croissance mycélienne.

Dans cet essai, nous avons choisi 08 isolats qui ont un degré de pathogénicité variable (le plus faible jusqu'au plus fort) et 02 isolats n'appartiennent pas à la forme spéciale *albedinis*, l'un de ces isolats est *Fusarium oxysporum* f.sp *ciceri* et l'autre *Fusarium oxysporum*, le choix des trois substrats carbonés utilisés est porté sur un sucre simple (glucose) et les deux autres beaucoup plus complexes (acide polygalacturonique et pectine de citron) incorporés dans le milieu Czapeck à raison de 1% séparément.

Après sept jours d'inoculation nous avons évalué la croissance radiale des colonies de 10 isolats, par la mesure de deux diamètres perpendiculaires (Graphe 01), puis nous avons transformé la moyenne de trois mesures en pourcentage de croissance en prenant glucose comme substrat témoin, les résultats du pourcentage de croissance sont exprimés en tableau 04, nous avons noté que le maximum du pourcentage de croissance chez *Foc* a atteint 99,1% et 93,9 % avec la pectine et l'acide polygalacturonique (**Tableau 10**) et nous avons remarqué qu'il existe une légère différence de la croissance des isolats sur les différents substrats, et l'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative ( $F=4,41$  ;  $p=0,96$ ).

Les caractères culturels (couleur du mycélium et aspect de la colonie) chez les 10 isolats n'a révélé aucun changement en fonction de la source de carbone, sauf que nous avons noté une légère variation avec l'isolat KN1 qui présente un aspect ras muqueux avec acide polygalacturonique et cotonneux dense avec glucose et pectine de citron.

Selon les résultats obtenus, les sucres complexes testés n'ont pas influencé la croissance mycélienne de manière identique. Aucun substrat ne semble idéal pour la croissance linéaire et la sporulation en même temps. D'autre part, les isolats se comportent de façon identique dans les mêmes conditions, d'où la nécessité de faire un compromis pour le choix du milieu ou du substrat carboné idéal pour le pathogène étudié.



Graph 01: Mesures de la croissance radiale de 10 isolats de *Fusarium oxysporum* sur milieu Czapeck 1% de différents substrats

Tableau 10 : Pourcentage de la croissance (P%) des isolats de *Fusarium oxysporum*

Isolat	Pectine	Acide polygalacturonique
<i>Foc</i>	96,2	93,9
<i>Fo</i>	99,1	99,8
<i>KN1</i>	92,0	90,9
<i>KN2</i>	88,3	87,7
<i>KN3</i>	99,3	89,6
<i>KN4</i>	68,4	94,2
<i>KN5</i>	99,2	92,9
<i>KN6</i>	50,5	50,4
<i>KN7</i>	99,0	99,0
<i>KN8</i>	96,7	93,7

#### 4) Recherche de l'activité pectinolytique.

##### 4-1) Dosage de l'activité Pectine méthylestérase

L'incubation en milieu tamponné additionné d'un substrat pectine de citron et acide polygalacturonique en présence de filtrats de culture de nos isolats, provoque une acidification du milieu réactionnel (témoin d'une présence d'une activité du genre hydrolase) qui prouve la présence d'une activité pectinolytique, cette activité est mesurée de manière quantitative selon la technique classique du pouvoir réducteur.

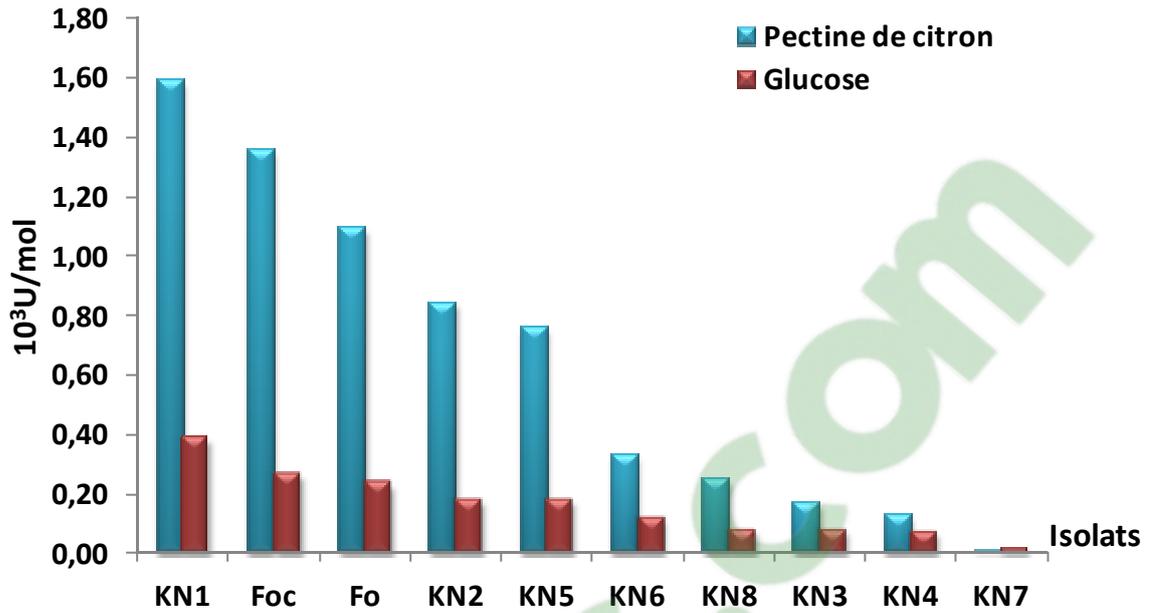
La recherche de l'activité PME chez tous les isolats a montré que cette enzyme est présente dans le filtrat de culture et que la quantité estimée est beaucoup plus importante avec le substrat pectine de citron qu'avec glucose.

Nous avons noté que cette activité était variable selon les isolats, la forte activité de cette enzyme est enregistrée et qui est égale (1,59 ; 1,36 et 1,1  $10^3$  U/mole) pour les isolats suivants KN1, Foc et Fo respectivement dans le filtrat de culture qui contient de la pectine de citron et cette activité est supérieure 4 fois à celle détectée avec le glucose, la faible activité de PME quelque soit le substrat (pectine de citron ou glucose) est observée chez l'isolat KN7 qu'elle égale (0,01 et 0,02  $10^3$  U/mole) respectivement.

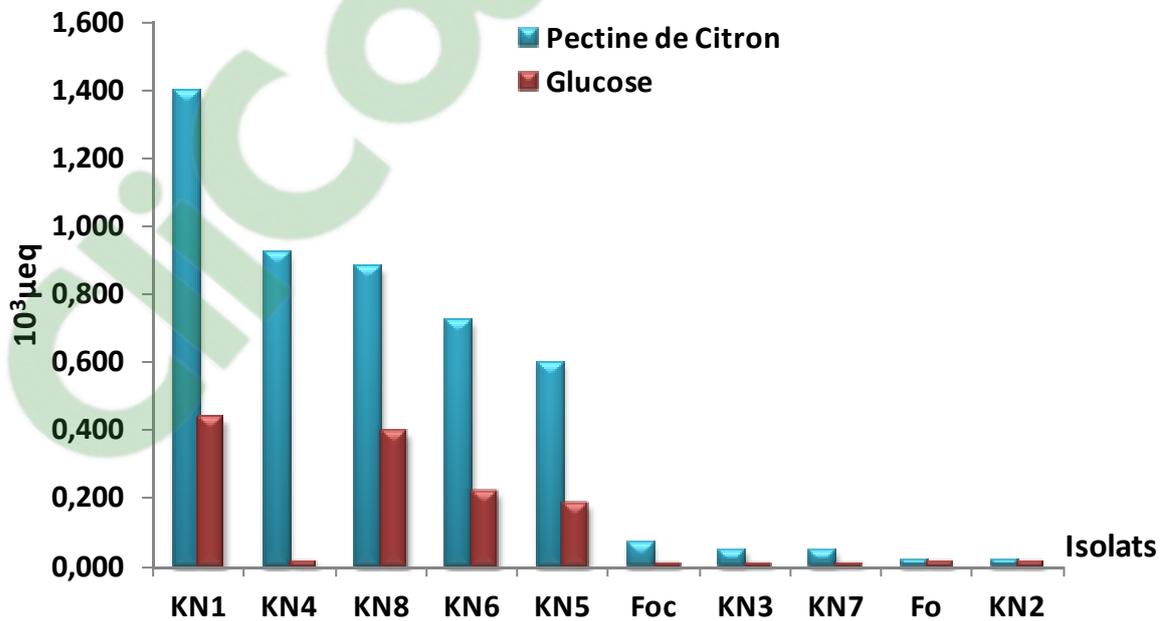
Nous avons remarqué que cette activité est présente chez tous les isolats de *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* et aussi chez l'isolat de *Fusarium oxysporum f.sp ciceri* et *Fusarium oxysporum* (Graphe 02).

##### 4-2) Dosage de l'activité Polygalacturonase

La mesure de l'activité de la PG des dix isolats a été détectée dans les filtrats de culture du milieu Czapeck en fonction de différentes sources de carbone (glucose et pectine de citron) après 10 jours d'incubation. En effet, l'activité de la PG estimée est importante après la dégradation de la pectine. Les valeurs enregistrées montrent que l'isolat KN1 a une activité égale 1,39  $10^3$   $\mu$ egr dans le filtrat de culture amendé de 1% de pectine par rapport au glucose, que cette activité égale 0,44  $10^3$   $\mu$ eg, et nous avons enregistré que cette activité égale (0,07 et 0,02  $10^3$   $\mu$ eg) chez les isolat Foc et Fo avec la pectine et (0,02  $10^3$   $\mu$ eg) pour les deux isolats avec glucose, respectivement, par ailleurs cette activité était presque nulle avec les autres isolats de la forme spéciale *albedinis* (Graphe 03).



Graphe 02: Mesure de l'activité pectine méthylestérase dans les filtrats de culture amendé 1% de Glucose et Pectine de citron chez 10 isolats de *Fusarium oxysporum*



Graphe 03 : Mesure de l'activité polygalacturonase dans les filtrats de culture amendé 1% de Glucose et Pectine de citron chez 10 isolats de *Fusarium oxysporum*

Matrice de corrélation (Spearman) :

Variables	PG	PME	Pouvoir pathogène
PG	1	0,122	-0,985
PME	0,122	1	-0,050
Pouvoir pathogène	-0,985	-0,050	1

*Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification  $\alpha=0,05$*

p-values

Variables	PG	PME	Pouvoir pathogène
PG	0	0,731	< 0,0001
PME	0,731	0	0,903
Pouvoir pathogène	< 0,0001	0,903	0

*Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification  $\alpha=0,05$*

Coefficients de détermination (Spearman) :

Variables	PG	PME	Pouvoir pathogène
PG	1	0,015	0,969
PME	0,015	1	0,002
Pouvoir pathogène	0,969	0,002	1

L'évaluation du pouvoir pathogène et la capacité de produire deux types d'enzymes pectine méthylestéras et polygalacturonase dans les filtrats de culture amendé de pectine et glucose de dix isolats a été analysé par le test de corrélation de Spearman, qui a dégagé une forte corrélation entre le pouvoir pathogène et l'enzyme polygalacturonique et nous n'avons pas observé cette corrélation avec la pectine méthylestérase.

### **5) L'influence du pH sur la croissance mycélienne**

Le rendement de la biomasse a été déterminé quotidiennement par filtration sur papier filtre, le mycélium récupéré est rincé avec de l'eau distillée, puis essoré entre deux papiers filtre, ensuite pesé, le pH des filtrats de culture est mesuré parallèlement (tableau 11).

Nous avons remarqué que la variation du pH des filtrats de culture amendé de pectine, acide polygalacturonique et glucose à pH 4 initiale est augmentée au fur à mesure que le temps d'incubation, cette augmentation a commencé graduellement dès le premier jour entre 4,3-4,8, puis un changement radicale est observé à partir du 5<sup>ème</sup> jour, ou nous avons enregistré que ces valeurs ont atteint les pH entre 9-9,3 et ce que nous avons remarqué et que le poids frais de mycélium ne cesse d'augmenter malgré les changements brusques de pH.

La même chose pour le pH 6, qui a légèrement augmenté pendant les 5 premiers jour, puis il s'est tendu vers les pH qui avoisine 9,1-9,3. Le poids du mycélium a aussi connu une augmentation linéaire.

Pour le cas du pH 8, nous avons remarqué une diminution du pH à 5,5 avec le substrat pectine pendant les 5 premiers jours, avec le substrat glucose nous avons remarqué une perturbation des pH, il était stable pendant les deux premiers jours, puis a commencer à chuter jusqu'à atteindre pH 4,5 le 4<sup>ème</sup> jour, ensuite une augmentation graduelle est observé jusqu'à le dernier jour d'incubation, par contre avec le substrat acide polygalacturonique le pH était plus ou moins stable, malgré toutes ces perturbation au niveau du pH, nous avons constaté que le poids frais du mycélium a connu une progression linéaire.

## 6) L'influence des substrats et temps d'incubation sur l'activité pectinolytique :

### 6-1) Activité enzymatique Pectine méthylestréase (PME)

Cette partie est consacrée au suivi de la cinétique enzymatique (Pectine Méthyl estérase, Polygalacturonase et Pectine Lyase) à plusieurs facteurs ; différents substrats (pectine de citron, acide polygalacturonique et glucose), différents pH (4 ; 6 et 8) et le temps d'incubation pendant 10 jours, nous avons utilisé l'isolat KN1 dans ce test pour son degré de pathogénicité élevé qui a atteint 99,3% et pour sa capacité de secréter les enzymes (PME et PGase) dans les filtrats de culture de milieu czapeck amendé de glucose et pectine de citron à raison 1%, incubé pendant 10 jours.

L'activité PME est mesurée de la même manière décrite précédemment. Au cours de cet essai nous avons voulu mesurer l'activité enzymatique le jour même de la filtration, sinon, on les conserve à 0°C, par contre le poids du mycélium et le pH du milieu sont enregistrés quotidiennement.

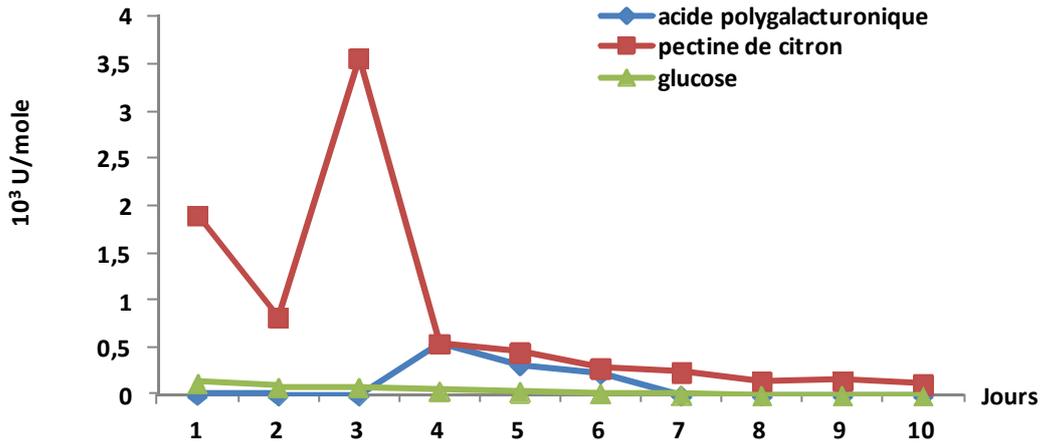
La mesure de cette activité dans les filtrats de culture du milieu czapeck à pH 4, était très faible, avec le substrat d'acide polygalacturonique, voir nulle pendant les premiers jours, puis elle a augmenté légèrement au 4<sup>ème</sup> jour en atteignant ( $0,55 \cdot 10^3$  U/mole) puis à commencer à chuter jusqu'à le 10<sup>ème</sup> jour, avec le substrat glucose l'activité PME a enregistré  $0,13 \cdot 10^3$  U/mole le 1<sup>er</sup> jour puis a commencé à chuter, une forte activité de PME est enregistrée avec le substrat pectine de citron ou nous avons enregistré  $1,91 \cdot 10^3$  U/mole, puis une diminution légère qui atteint  $0,83 \cdot 10^3$  U/mole au 2<sup>ème</sup> jour, puis une augmentation est observée le 3<sup>ème</sup> jour, ou l'activité a atteint le maximum  $3,57 \cdot 10^3$  U/mole suivie de déclin jusqu'au dernier jour d'incubation (Graphe 04).

Au pH 6, l'activité de PME était presque nulle avec le substrat glucose durant tous les jours d'incubation, avec le substrat acide polygalacturonique l'activité était nulle le premier jour, mais a commencé d'augmenter légèrement à  $0,83 \cdot 10^3$  U/mole le 2<sup>ème</sup> jour, puis elle est restée stable pendant 2 jours ( $0,55 \cdot 10^3$  U/mole), le 4<sup>ème</sup> jour elle a baissé presque de moitié, suivie d'une légère augmentation le 6<sup>ème</sup> jour, puis une diminution brusque durant les derniers jours d'incubation. Par contre l'activité avec le substrat s'est comportée différemment, dès le 1<sup>er</sup> jour a commencé d'augmenter ou elle a atteint  $2,01 \cdot 10^3$  U/mole le 7<sup>ème</sup> jour puis une diminution légère jusqu'au dernier jour (Graphe 05).

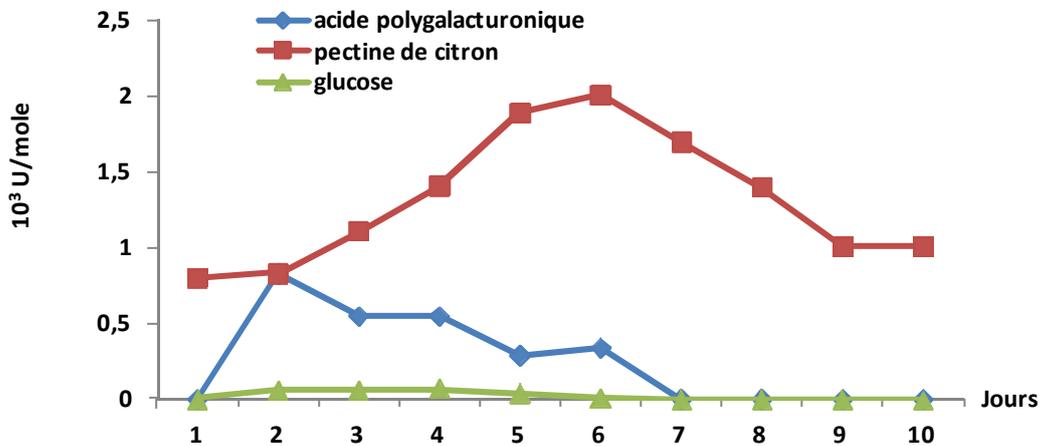
Tableau 11 : Etude de la cinétique de croissance mycélienne de l'isolat KN1 et variation du pH milieu Czapeck amendée de différentes sources de carbone (glucose, pectine de citron et acide polygalacturonique) durant 10 jours d'incubation

	Acide polygalacturonique						Pectine de citron						Glucose					
	pH4	Pds	pH6	Pds	pH8	Pds	pH4	Pds	pH6	Pds	pH8	Pds	pH4	Pds	pH6	Pds	pH8	Pds
<b>1<sup>er</sup> jour</b>	4,3	0,05	6,8	0,06	7,5	0,06	4,5	0,11	5,2	0,1	5,7	0,06	4,8	0,08	6	0,06	7,5	0,11
<b>2<sup>ème</sup> jour</b>	4,7	0,13	7	0,1	7,6	0,12	5,3	0,1	6	0,1	6,8	0,11	4,9	0,11	6	0,17	7,5	0,09
<b>3<sup>ème</sup> jour</b>	5,3	0,15	7,2	0,15	8,5	0,15	6	0,07	6,5	0,18	6,5	0,18	5,6	0,1	6	0,17	6,5	0,09
<b>4<sup>ème</sup> jour</b>	4,9	0,15	6,8	0,15	8,1	0,1	5,5	0,15	5,7	0,2	5,8	0,22	5,9	0,25	4,5	0,15	4,6	0,2
<b>5<sup>ème</sup> jour</b>	5,3	0,26	7,3	0,29	8,5	0,3	6,9	0,18	7,1	0,3	6	0,25	7,1	0,31	7,2	0,25	6,8	0,31
<b>6<sup>ème</sup> jour</b>	9,3	0,35	9,4	0,36	9	0,49	8,7	0,58	8,9	0,6	8,9	0,64	9	0,64	9,1	0,68	9,1	0,53
<b>7<sup>ème</sup> jour</b>	9,2	0,41	9,2	0,41	9,2	0,28	8,9	0,68	8,9	1,1	8,8	0,49	9,2	0,75	9,2	0,68	9,2	0,51
<b>8<sup>ème</sup> jour</b>	9,2	0,29	9,3	0,34	9,2	0,3	9	0,6	9	0,42	9,2	0,5	8,9	0,68	9	0,53	9,1	0,45
<b>9<sup>ème</sup> jour</b>	9	0,44	9	0,33	9,3	0,23	8,7	0,39	9	0,35	9	0,38	8,9	0,44	8,8	0,33	8,9	0,23
<b>10<sup>ème</sup> jour</b>	8,7	0,52	9,1	0,45	9,1	0,31	8,9	0,45	8,9	0,42	8,6	0,45	9	0,73	9	0,6	9,1	0,53

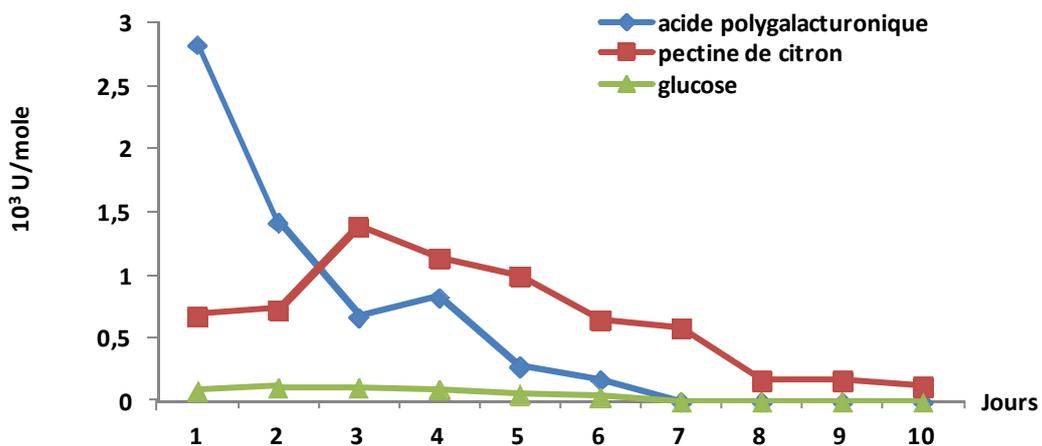
Pds : poids frais du mycélium



Graph 04: Evaluation de l'activité PME dans les filtrats de culture amendé de différents substrat au pH 4.



Graph 05: Evaluation de l'activité PME dans les filtrats de culture amendé de différents substrat au pH 6.



Graph 06: Evaluation de l'activité PME dans les filtrats de culture amendé de différents substrat au pH 8

La mesure de l'activité PME au pH8 était presque nulle durant l'incubation avec le substrat glucose, par contre, nous avons enregistré une forte activité qui égale  $2,83 \cdot 10^3$  U/mole le 1<sup>er</sup> jour, puis a commencé à diminuer jusqu'à son annulation depuis le 7<sup>ème</sup> jour. L'activité PME a commencé d'augmenter depuis le premier jour jusqu'au 3<sup>ème</sup> jour ou nous avons noté qu'elle égale  $1,39 \cdot 10^3$  U/mole puis a commencé à diminuer progressivement jusqu'au dernier jour d'incubation (Graphe 06).

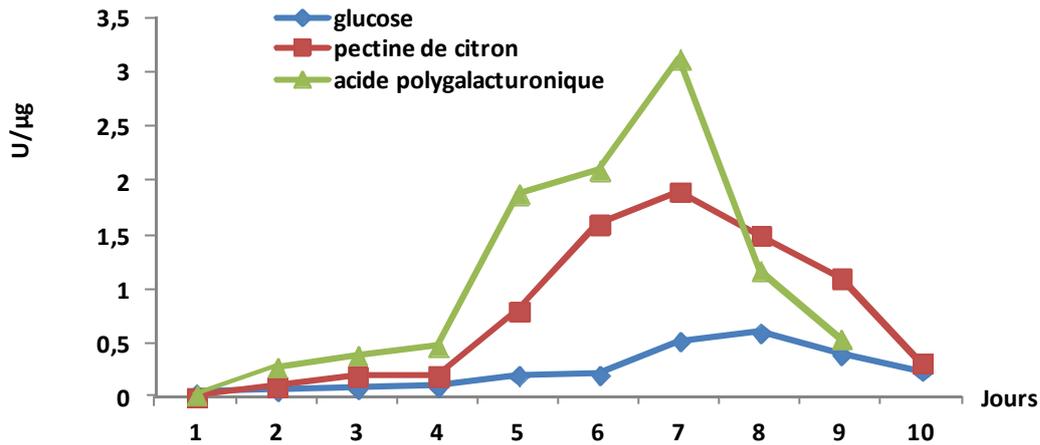
## **6-2) Activité enzymatique de pectine lyase**

L'activité de pectine lyase a été quantifiée dans les filtrats de culture czapeck amendé différents sources de carbone à raison de 1%, et l'évaluation de cette activité est étudiée en prenant compte de deux facteurs (temps d'incubation et différents pH 4 ; 6 et 8).

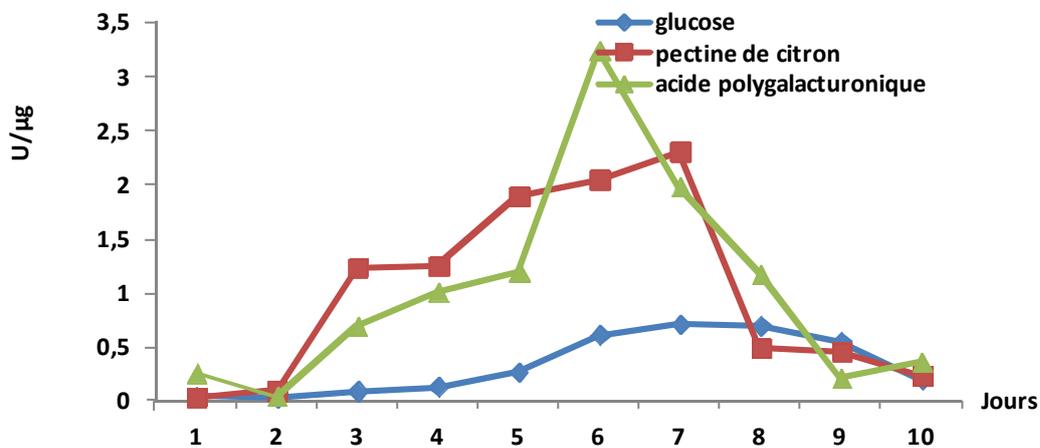
Nous avons noté que cette activité est faible dans les filtrats de culture contenant le glucose à différents pH, nous avons enregistré (0,037 ; 0,045 et 0,28 U/ $\mu$ g) les premiers jour aux pH (6, 4 et 8) respectivement, la cinétique a évolué en fonction du temps d'incubation ou nous avons enregistré l'activité maximale de cette enzyme égale 0,6 U/ $\mu$ g au 8<sup>ème</sup> jour à pH 4; 0,71 U/ $\mu$ g au 7<sup>ème</sup> jour à pH 6 et 0,93 U/ $\mu$ g au 6<sup>ème</sup> jour à pH8, puis a commencé à chuter jusqu'au 10<sup>ème</sup> jours.

La cinétique enzymatique de PL dans les filtrats de culture contenant la pectine de citron à différents pH, a suivi un parcours normale, cette cinétique a commencé avec une faible activité les premiers jours ou nous avons enregistré qu'elle était nulle à pH4 et elle a égale (0,031 U/ $\mu$ g) à pH 6 et elle était 10 fois supérieur 0,31 U/ $\mu$ g à pH 8, le maximum de cette activité est observée en fonction du pH, à pH 4 l'activité égale (1,9 U/ $\mu$ g) le 7<sup>ème</sup> jour , à pH 6 est enregistré (2,31 U/ $\mu$ g) le 7<sup>ème</sup> jour et à pH 8, elle égale 2,23 U/ $\mu$ g le 5<sup>ème</sup> jour, puis a chuté jusqu'au dernier jour d'incubation.

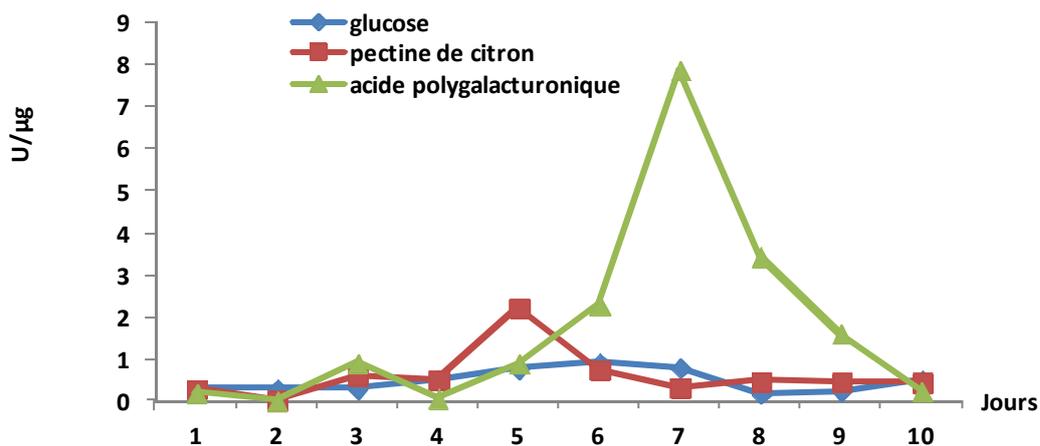
La forte activité est observé dans les filtrats de culture contenant l'acide polygalacturonique à différents pH ou nous avons noté que cette activité a atteint le pic maximum (3,13 U/ $\mu$ g, 3,24 U/ $\mu$ g et 7,87 U/ $\mu$ g) au différents pH (4 ; 6 et 8) respectivement, cette activité a suivi le parcours normale d'une cinétique enzymatique, a commence par de faible activités, puis a augmenté au cours du temps jusqu'elle atteint le maximum, puis a commencé à chuter jusqu'au dernier jour d'incubation (Graphes 7, 8 et 9).



Graph 07: Evaluation de l'activité PL dans les filtrats de culture amendé de différents substrat au pH 4.



Graph 08: Evaluation de l'activité PL dans les filtrats de culture amendé de différents substrat au pH 6.



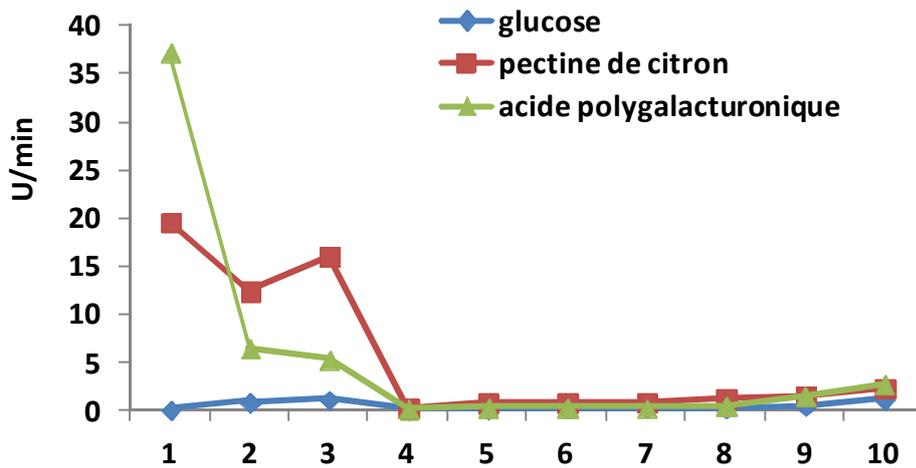
Graph 09: Evaluation de l'activité PL dans les filtrats de culture amendé de différents de substrat au pH 8.

### **6-3) Activité enzymatique polygalacturonase**

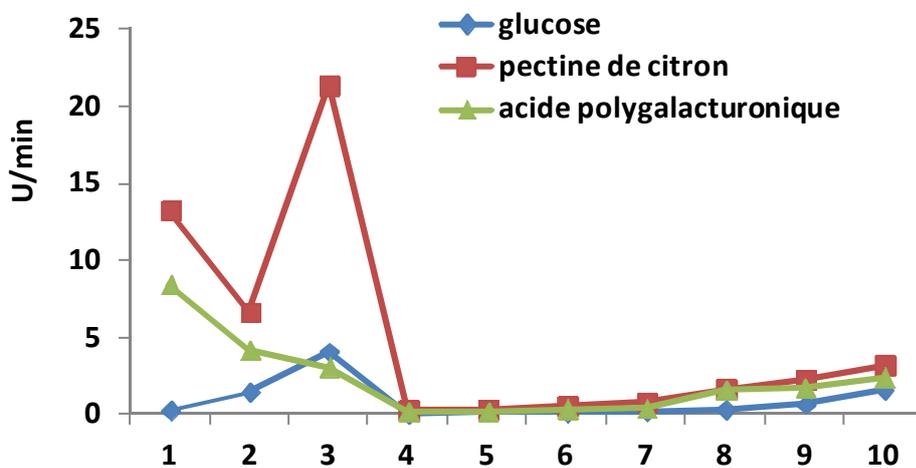
La recherche de l'activité polygalacturonase dans les filtrats de culture du milieu Czapeck amendé différentes sources de carbone et à différents pH est mesurée par la méthode de Muller.

L'activité de PGase varie entre (0,187 – 1,59 U/min) aux différents pH (4, 6 et 8) dans les filtrats de cultures contenant glucose. Par contre la forte activité est enregistrée au premier jour avec les substrats pectine de citron et acide polygalacturonique au différents pH (4, 6 et 8) l'activité est égale (30,9 et 37,3 U/min) avec acide polygalacturonique et pectine de citron aux pH 8 et 4 respectivement, puis a chuté jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour ou nous avons enregistré un faible taux d'activité qui se situe entre (0,36 - 2,41 U/min) ; (0,315 - 3,2 U/min) et (0,279 – 2,52 U/min) dans les filtrats de culture qui contient la pectine de citron aux pH 4, 6 et 8 respectivement, et elle varie entre (0,3-2,85 U/min) ; (0,21-2,42 U/min) et (0,59-2,3 U/min) dans les filtrats de culture qui contient acide polygalacturonique aux pH 4, 6 et 8 respectivement, ces résultats sous illustrés dans les Graphe 10, 11 et 12.

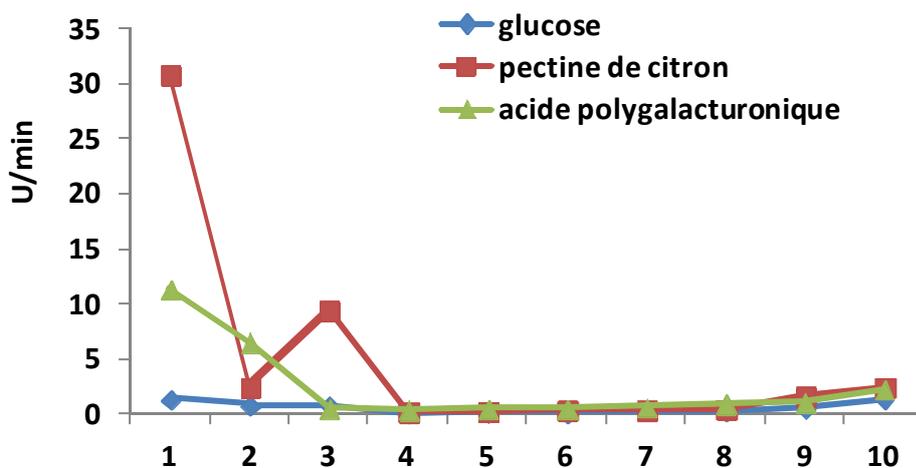
Suite aux analyses statistiques du test ANOVA à deux facteurs (pH et temps d'incubation) sans mesures répétées sur le rendement de biomasse et la variation du pH du milieu de culture amendé avec différents substrats à différents pH sur les activités pectinolytiques, l'analyse du test de corrélation de Spearman a dégagé une forte corrélation entre les facteurs qui influent sur les activités PME, PG et PL.



Graphe 10 : Evaluation de l'activité PGase dans les filtrats de culture amendé de différents substrats à pH 4



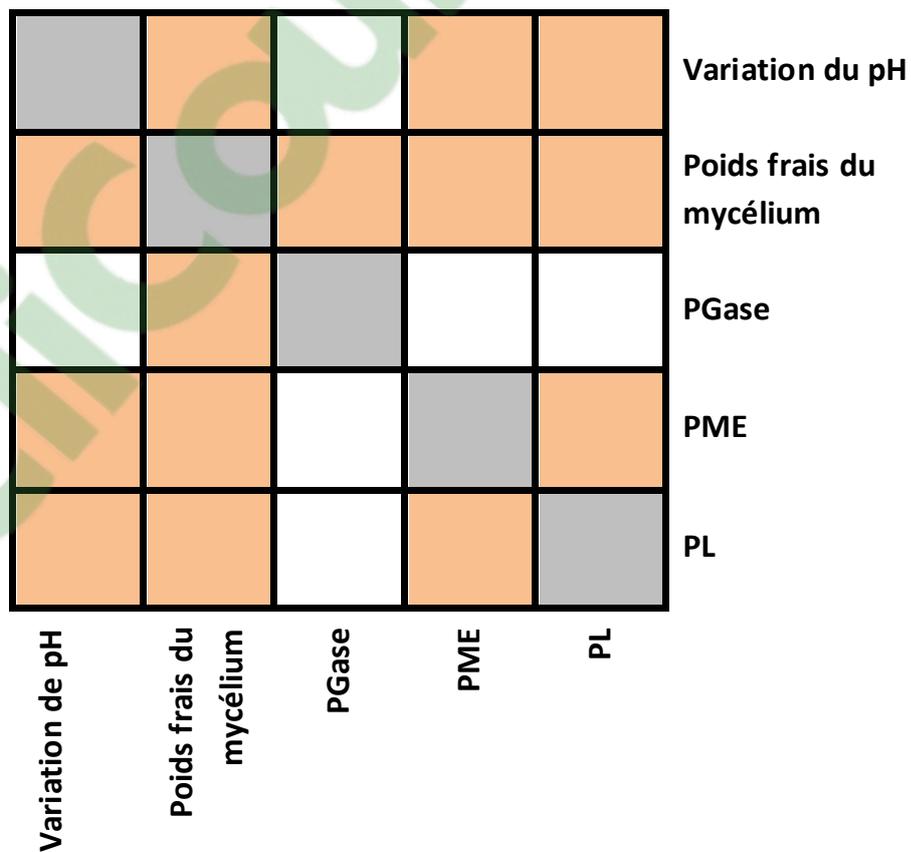
Graphe 11 : Evaluation de l'activité PGase dans les filtrats de culture amendé de différents substrats à pH 6



Graphe 12 : Evaluation de l'activité PGase dans les filtrats de culture amendé de différents substrats à pH 8

Coefficients de détermination (Spearman) :

Variables	variation de pH	Poids frais du mycélium gr	PGase	PME	PL
variation de pH	1	0,513	0,020	0,196	0,124
Poids frais du mycélium gr	0,513	1	0,089	0,123	0,128
PGase	0,020	0,089	1	0,029	0,014
PME	0,196	0,123	0,029	1	0,052
PL	0,124	0,128	0,014	0,052	1



#### **6-4) Analyse des effets individuels des facteurs**

Les résultats précédents ont démontré l'importance des sources de carbones (glucose, pectine de citron et acide polygalacturonase), des différents pH et du temps d'incubation sur l'activité pectinolytique.

Les effets de ces facteurs sur la production d'enzymes pectinase par l'isolat KN1 et le rendement en pectinase rapporté à la biomasse ont été étudié simultanément en utilisant la méthodologie des plans d'expériences. La croissance de l'isolat étant considérée comme une réponse complémentaire, l'objectif de cette étude a consisté à établir les effets de chaque facteur contrôlé dans le domaine expérimental considéré.

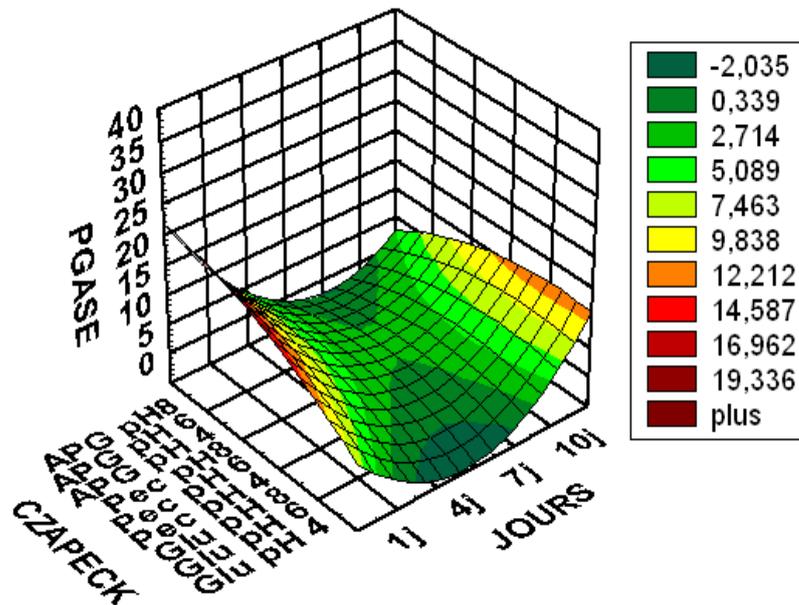
D'après l'analyse de la variance obtenue pour les réponses biomasse et activité pectinolytique. Il est possible de faire une analyse des principales influences des facteurs sur les différentes activités pectinolytique, bien que les réponses ne soient pas au centre du domaine expérimental.

La relation entre les différentes variables opératoires et la réponse étudiée est illustrée dans les représentations tridimensionnelles des surfaces de réponses (Graphes 13, 14 et 15).

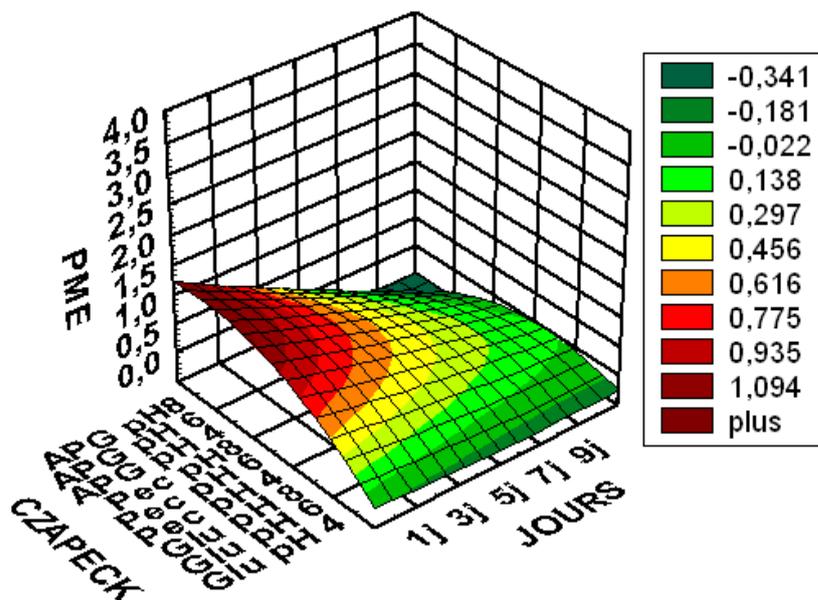
Le graphe 13 considère l'effet des sources de carbone et du temps d'incubation simultanément ; cet effet indique clairement la direction à suivre pour maximiser la production de polygalacturonase. Dans le cas présent, une augmentation de ces facteurs, nous permettrait de resituer le domaine nécessaire à la détermination des optima. En ce qui concerne le rendement de PGase, l'effet le plus important est donné par la source de carbone acide polygalacturonique. Le temps d'incubation ne semble pas favorable à production de cette enzyme,

Le graphe 14 montre ainsi la surface de réponse correspondant aux deux paramètres qui ont un effet linéaire sur le rendement de la production de la pectine méthylestérase dans des filtrats de culture amendé de différents source de carbone à différents pH, avec un effet beaucoup plus visible pour l'acide polygalacturonique.

Le graphe 15, l'importance de la présence des sources de carbone à différents pH est clairement établie. Le rendement de la pectine lyase est quasiment stable durant le temps d'incubation. Au-delà, nous avons observé une évolution toujours linéaire.



Graph 13 : Surface de réponse en fonction des trois couples de paramètres (PGase, différentes sources de carbone et temps d'incubation)  
 L'équation donnant le rendement de la PGase en fonction des paramètres étudié :  $Z=519,469-56,359*x+47,229*y+0,361*x*x-0,198*x*y-0,123*y*y$



Graph 14 : Surface de réponse en fonction des trois couples de paramètres (PME, différentes sources de carbone et temps d'incubation)  
 L'équation donnant le rendement de la PME en fonction des paramètres étudié :  $z=-366,928+1,283*x+5,75*y+0,002*x*x-0,016*x*y-0,019*y*y$



## Discussion

L'étude morphologique de nos isolats, a montré au niveau morphotype et la couleur du mycélium, sans qu'il y soit une présence de masse sporodichial. Cette étude est l'exercice répété de l'observation des cultures de *Fusarium*, montre des différences mineurs portant sur la pigmentation ou l'abondance du mycélium aérien, on retrouve toujours les mêmes types morphologiques, en fonction des descriptions dans la littérature des études effectuées par (Ouinten, 1996) sur *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*, puis sur le *Fusarium* d'origines divers dont *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* (Henni, 1994 ; Henni, 1998, Karkachi, 2002) et sur le *Fusarium oxysporum f.sp vasinfectum* (Assigbeste, 1993), ces auteurs ont montré que le morphotype duveteux relativement peut pigmenter est toujours présent dans les isolats fraîchement réalisés. Les observations macroscopiques et microscopiques n'ont pas permis de différencier entre les isolats.

Le pouvoir pathogène des 10 isolats a été estimé par le nombre de plantules de palmier dattier flétris inoculées par rapport aux plantules témoins, ce test a souvent été effectuée et a conduit à la définition des formes spéciales théoriquement inféodées à une plante hôte unique (Armstrong et Armstrong, 1975 ; Assigbeste, 1997 ; Henni, 1998 ; Karkachi, 2002).

Les travaux de Lalaoui *et al*, 2000 sur trois isolats de *Phaeosphaeria nodorum* ont montré que l'isolat fortement agressif produit plus d'enzymes par rapport aux deux autres isolats faiblement agressifs. Xylanase est l'enzyme la plus produite et la plus active comparable aux autres enzymes, ce qui suggère qu'elle est l'enzyme clé dans la pathogénicité.

Les isolats de *Mycosphaerella graminicola* ont été évalué en termes de lésion provoqué d'une part et la production des pycnides sur le blé d'autres part, en plus, les isolats ont été comparés pour leurs capacité de produire des enzymes dans les filtrats de culture, ensuite, ils ont fait une corrélation significative entre la production d'enzymes *in-vitro* du xylanase et pectinase, qui sont impliquées dans la pathogénicité (Douaiher *et al*, 2007)

Yoshida *et al*, 2003 ont montré que le champignon *Rhizopus oryzae* produit trois enzymes (polygalacturonase, pectate lyase et pectine lyase) dans les filtrats de culture contenant de pectine et de racines macéré séparément.

La recherche de l'activité pectine méthylestérase et polygalacturonase d'*Erwinia*, n'ont pas été détecté dans les filtrats de cultures, par contre elles étaient

présente dans l'extrait des racines de carotte et de poire. D'autre part, la présence de pectine lyase a été détectée dans les filtrats de culture et surnageant des extraits de tissus végétaux infectées (El Hendamy *et al*, 2002).

La polygalacturonase produite par *Penicillium italicum* et *Penicillium digitatum* facilite la pénétration des hyphes dans la paroi cellulaire des fruits du citronnier durant le processus de dégradation (Barntore et Brown, 1980).

Ces auteurs ont signalé que les tissus infectés par *Penicillium iurlicum* présentent une déméthylation importante de la pectine, un gonflement de la paroi cellulaire et une plasmolyse des cellules. Le rôle que peuvent jouer les enzymes pectiques dans la pathogénèse *Alternaria citri* et *Alternaria alternata* par Isshiki *et al*, 2001 été signalé par Adisa et Faloja, 1982). Ainsi, l'application de la PTE et la PG aux oranges provoque une macération rapide des tissus.

Cette étude nous a permis de différencier entre les isolats par l'étude de variabilité morphologique et le degré de pathogénicité d'une part, et à la capacité de ces isolats de synthétiser des enzymes pectinolytiques d'autre part, le champignon phytopathogène doit être capable de sécréter les enzymes hydrolytiques pour dégrader les parois des cellules des tissus, qui facilite sa pénétration et son invasion dans les plantes.

## 7) Influence des molécules sur la croissance mycélienne de l'isolat KN1

Les résultats de l'effet inhibiteur de la croissance mycélienne de 27 molécules (1,2,3-triazole, 1,2,4-triazole, oxidiazoles et ammonium quaternaire) testées à différentes concentrations (50,100, 200 et 400 ppm) séparément vis-à-vis de l'isolat KN1, sont assez comparables.

Les mesures des diamètres de la colonie sont calculés après 7 jours d'incubation à 25°C, nous avons enregistré aucune inhibition mycélienne pour les témoins, sauf un léger changement d'aspect de couleur des colonies (figure 14), pour certaines molécules comme la Khia1 qui a stoppé la croissance de l'isolat KN1 dès le 1<sup>er</sup> jour à la concentration 200 et 400 ppm (figure 15), l'évaluation de la biomasse de l'isolat KN1 a enregistré un effet inhibiteur variable selon la molécule et ses concentrations, même chose pour les témoins, nous avons noté une légère variations du poids frais du mycélium qui a atteint (1,8 gr ± 0,2) et avec la molécule Khia 6 le poids resté stable avec toute les concentrations qui varie entre (1,3 à 1 gr). L'étude statistique de cette partie a révélé une haute signification (p <0,001).

Grâce à ces résultats, nous avons pu transformer la croissance mycélienne en taux d'inhibition (TI%) qui nous a conduits à enregistrer une inhibition significative de la croissance mycélienne.

Les sept molécules triazoliques de la 2<sup>ème</sup> série ont eu un effet inhibiteur important, une diminution significative de la croissance mycélienne a été observée avec l'augmentation de la concentration des molécules, à cet effet, la croissance mycélienne a été complètement inhibé à la concentration de 400 ppm, alors qu'avec la 1<sup>ère</sup> série de triazole, on a enregistré un faible taux d'inhibition par rapport la 2<sup>ème</sup> série. Le taux d'inhibition élevé pour les molécules des deux séries a résulté en une diminution de la croissance de l'isolat KN1 de 91,18 % et 64,24% pour les molécules Zg6 et M5 respectivement.

Les molécules ammonium quaternaire de différentes concentrations ont affecté significativement la croissance de l'isolat KN1, des concentrations de 50 ppm et plus ont diminué significativement la croissance de l'isolat KN1, tandis qu'une concentration de 400 ppm a diminué la croissance mycélienne à un taux de 94,17%.

Les résultats révèlent également que les concentrations des molécules Kia1 incorporée au milieu PDA influence significativement la croissance de l'isolat KN1, et que l'augmentation de la concentration engendre une réduction de la croissance mycélienne particulièrement marqué lorsque le milieu est amendé de M. En effet,

une concentration de 400 ppm de cette molécule a causé une réduction de 100% de la croissance du champignon.

Après le calcul du taux d'inhibition nous avons procédé à la détermination de la dose d'inhibition 50% de la sensibilité de l'isolat aux vingt sept molécules testées, les concentrations d'inhibition ont été calculées comme suit, les pourcentages d'inhibition ont été transformés en probits (Finney 1971).

Les concentrations ont été transformées en logarithmes. Un graphique a été tracé avec les doses (log sur l'axe des abscisses et les probits sur l'axe des ordonnées. L'équation de la droite de régression déterminée par les points a permis de calculer les concentrations correspondant à 50% et 95% d'inhibition (exprimées en logarithmes), leurs antilogarithmes sont les CI50 et CI95 en parties par million, les résultats sont exprimés en microgramme par millilitre (**µg/ml**) à l'aide du logiciel Curveexpresse 1.41.

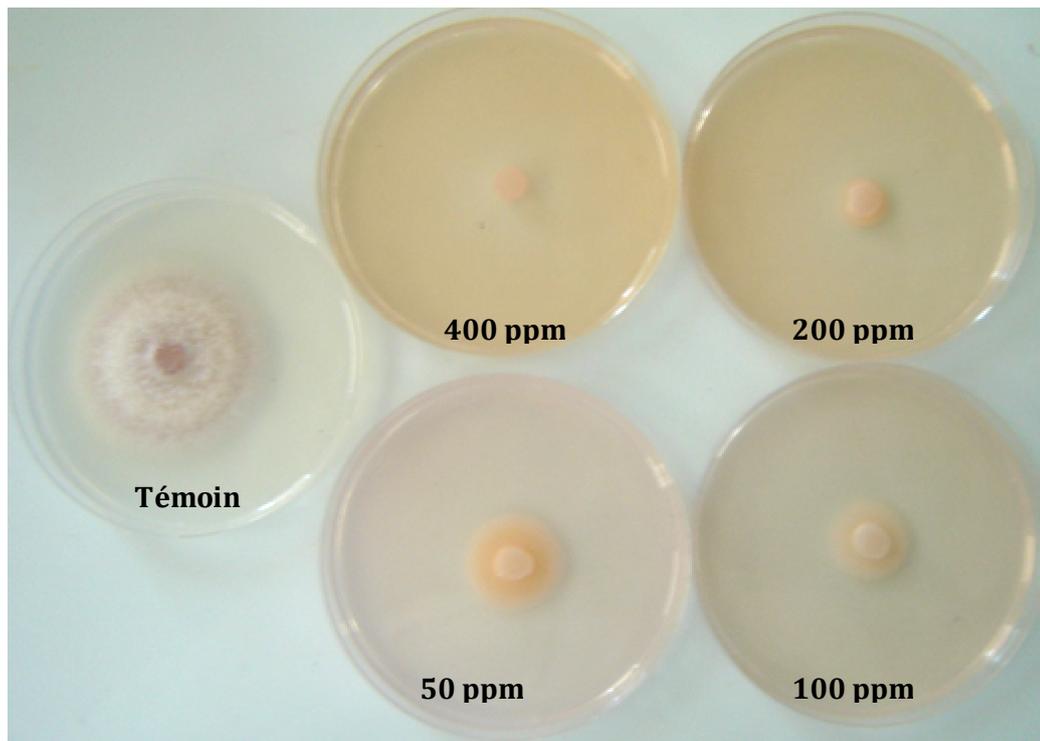
En présence de ces molécules, les valeurs de la CI50 et de la CI95, déterminées pour l'isolat KN1, sont présentées (Tableau 12). Les résultats montrent que les molécules de triazole de la 1<sup>ère</sup> série ont un effet inhibiteur relativement faible sur la croissance mycélienne les valeurs de la CI50 varie de (17,83 – 0,64 mg/ml) et la CI95 (8,42 – 14243,17 mg/ml) pour les molécules M5 et M1 respectivement. L'isolat *KN1* présente une sensibilité marquée aux molécules de triazole de la 2<sup>ème</sup> série à la molécule (CI50 varie entre 0,063 – 0,351 mg/ml) et que la CI95 varie entre (0,4 - 408, 65 mg/ml).

Les molécules de Khia et ammonium quaternaire réduit très significativement la croissance mycélienne de l'isolat KN1 avec des valeurs de la CI50 et de la CI95 qui sont faibles et proches.

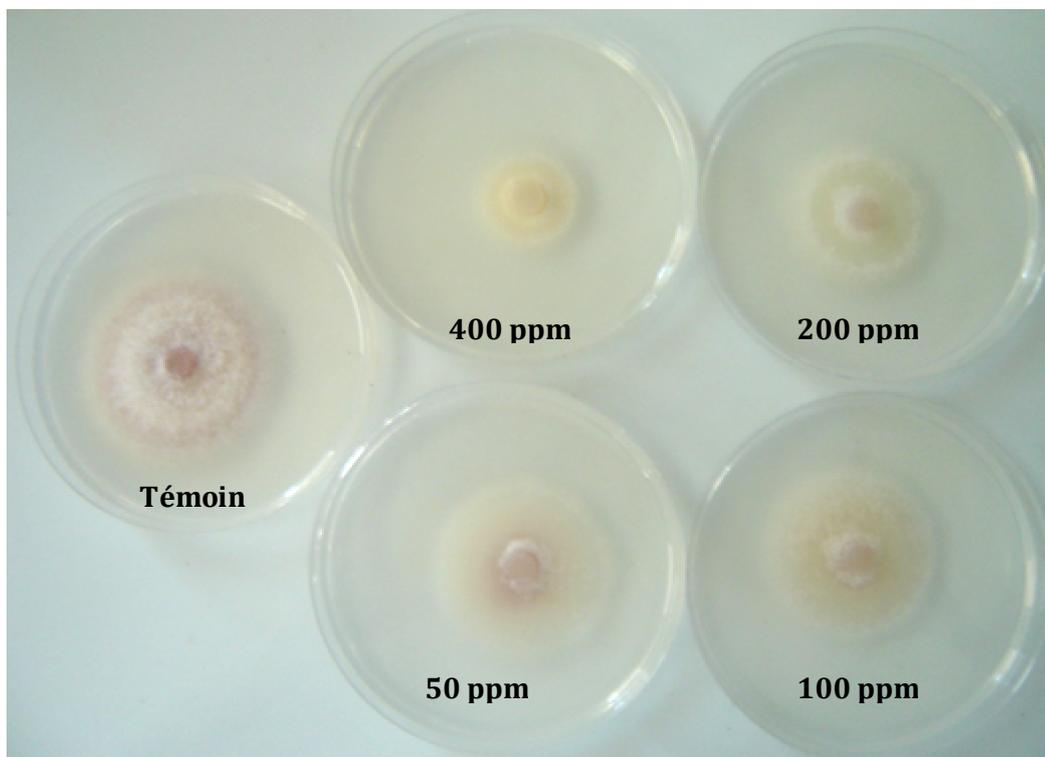
L'intégralité des données numériques, la mesure du diamètre et le poids frais du mycélium, le taux d'inhibition, les équations de régressions et les graphes sont donnés en annexe 03.

Tableau 12 : Valeurs de la CI50 et CI95 exprimées en (mg/ml) de différentes molécules testées vis-à-vis de l'isolat KN1.

		Molécules	IC50 (mg/ml)	IC95 (mg/ml)
<b>1,2,3-Triazole</b>	<b>1<sup>ère</sup> série</b>	Zg1	0,442	1,995
		Zg2	0,108	0,828
		Zg3	0,05	0,595
		Zg4	0,598	2,564
		Zg5	0,057	0,629
		Zg6	0,01	0,273
		Zg7	0,638	1,527
	<b>2<sup>ème</sup> série</b>	M1	17,839	14243,17
		M2	0,645	92,07
		M3	0,182	21,38
		M4	0,319	38,26
		M5	0,088	8,42
	<b>1,2,4-Triazole</b>	Kia1	0,003	0,4
		Kia2	0,009	0,82
Kia3		0,045	1,02	
Kia4		0,050	1,16	
Kia5		0,054	1,22	
Kia6		0,078	2,97	
Kia7		0,162	408,65	
<b>Ammonium quaternaire</b>	Mkh1	2432,75	4371126	
	Mkh2	0,013	0,19	
	Mkh3	0,053	5,52	
	Mkh4	0,068	5,57	
	Mkh5	0,002	0,054	
	Mkh6	0,047	1,64	
	Mkh7	0,077	27,18	
	Mkh8	0,04	0,35	



**Figure 14 :** Influence de la molécule Kia 1 sur la croissance mycélienne de l'isolat KN1 à différentes concentrations



**Figure 15 :** Influence de la molécule Kia 1 sur l'aspect morphologique de l'isolat KN1 à différentes concentrations

## 1) Influence des molécules sur l'activité enzymatique de l'isolat KN1

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence un possible effet inhibiteur de quatre molécules chimiques sur l'isolat KN1 par le suivi de l'activité des enzymes superoxyde dismutase et peroxydase.

**8-1) L'activité du superoxyde dismutase** recherchée dans les filtrats de culture de l'isolat KN1 traité avec quatre molécules des quatre séries, choisi sur la base de leur effet inhibiteur de la croissance mycélienne.

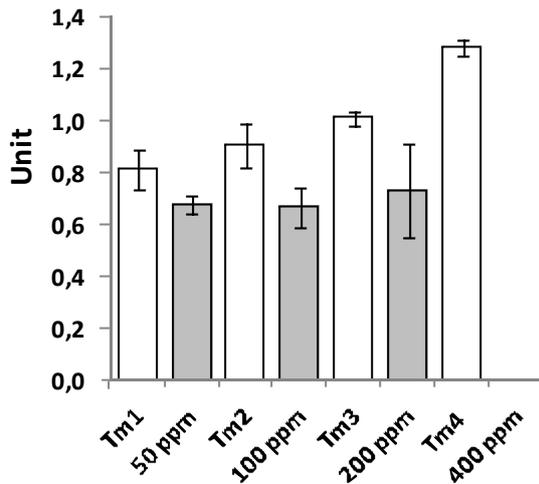
En premier lieu, nous voulons uniquement utiliser la concentration de la CI50 de chaque molécule, mais, il nous a paru nécessaire de tester toutes les molécules avec les mêmes concentrations déjà citées dans le chapitre matériels et méthodes.

Dans cet essai, nous avons noté un effet stimulateur de l'activité de la superoxyde dismutase chez les témoins, nous avons pris soin de comparer chaque concentration avec son propre témoin, nous avons alors enregistré que l'acétone à stimuler l'activité de la SOD, les valeurs enregistrées allent de (0,817 jusqu'à 1,287 unit/mn).

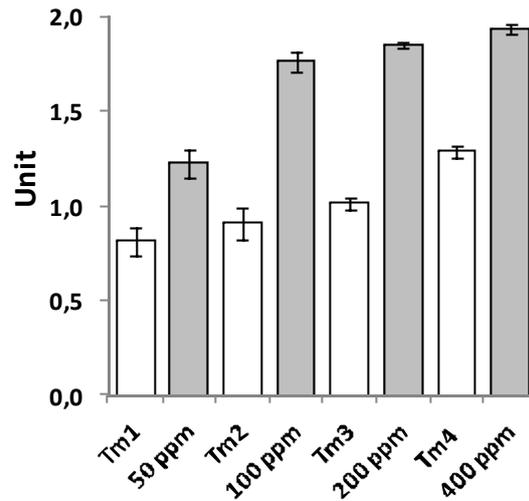
Les résultats de l'activité de la SOD est variable selon les molécules et leurs concentrations, avec le triazole 1<sup>ère</sup> série nous avons noté un faible effet inhibiteur de cette activité avec les témoins, les valeurs sont comprises entre (0,68 - 0,734 unit/mn) et nous avons enregistré une inhibition totale avec la concentration 400ppm (Graphe 16).

Pour les molécules Kia et triazole 2<sup>ème</sup> série, elles ont presque le même comportement avec l'activité de la SOD, nous avons observé un effet stimulateurs qui dépasse les valeurs des témoins. Les valeurs de l'activité de la SOD de différentes concentrations sont comprises entre (1,227 – 1,937 unit/mn) et (1,22 – 1,85 unit/mn) pour les molécules triazoles 2<sup>ème</sup> et série Kia respectivement (Graphes 17 et 18).

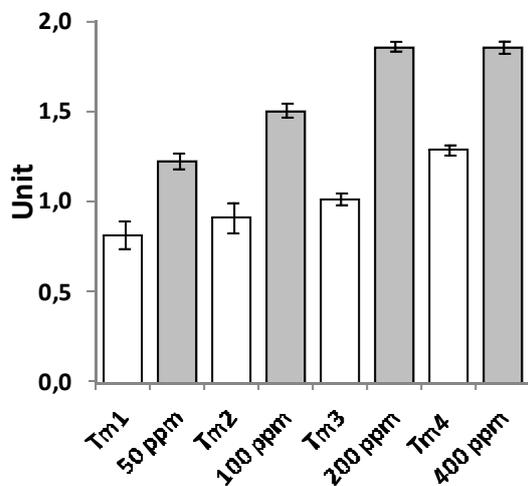
La molécule ammonium quaternaire les valeurs se rapproche entre elles avec, elle est près de 2 fois supérieure à celle du témoin sauf avec la concentration 400 ppm ou nous avons enregistré un léger effet inhibiteur comparé au témoin (Graphe 19).



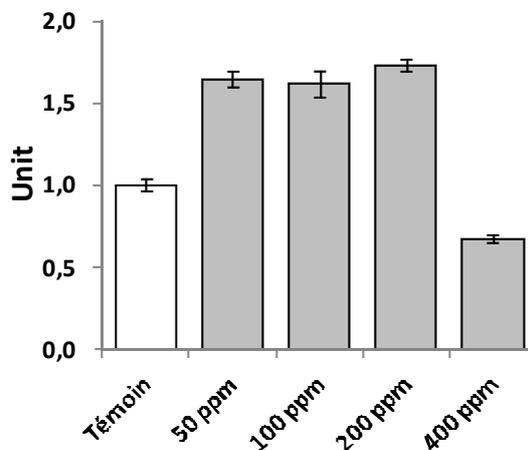
**Graphe 16:** Evaluation de l'influence de la molécule **Triole 1ère série** (différentes concentrations) sur l'activité de superoxide dismutase dans le filtrat de culture de l'isolat KN1



**Graphe 18:** Evaluation de l'influence de la molécule **Khia** (avec différentes concentrations) sur l'activité de la superoxide dismutase dans le filtrat de culture de l'isolat KN1



**Graphe 17:** Evaluation de l'influence de la molécule **Traizole 2ème série** (avec différentes concentrations) sur l'activité de la superoxide dismutase dans le filtrat de culture de l'isolat KN1



**Graphe 19:** Evaluation de l'effet de la molécule **ammonium quaternaire** (différentes concentrations) sur l'activité de la superoxide dismutase dans le filtrat de culture de l'isolat KN1

**8-2) La peroxydase** est connue pour sa capacité de réduire le peroxyde d'hydrogène, les résultats de cette activité augmentent de façon significative dans les filtrats de culture de l'isolat KN1 traité avec les quatre molécules choisi pour ce test (Graphes 20, 21, 22 et 23).

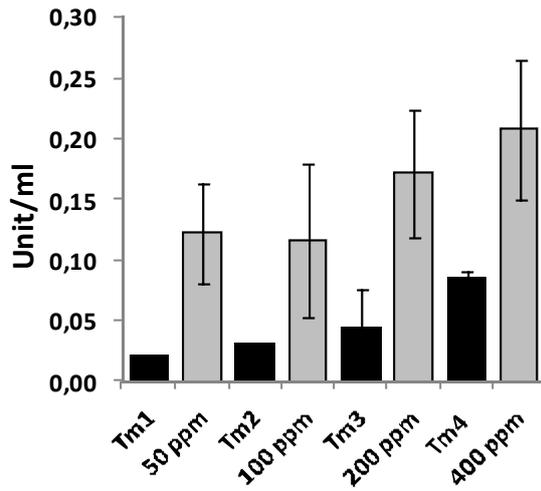
En analysant comparativement l'activité de la peroxydase, nous pouvons constater que cette activité recherché dans les filtrats de culture ne cesse d'augmenter graduellement sous l'effet de différentes concentrations, malgré que l'activité de la peroxydase a enregistré des valeurs considérablement plus faibles avec les témoins, mais la valeur maximale (0,6 unit/ml) est enregistrée avec la molécule Zg1 à la concentration 400 ppm, alors que la valeur minimale vient en provenance de la même molécule mais à la concentration 50 ppm.

Contrairement à la SOD, l'activité de la peroxydase a été double, voire triple pour le même comportement de Z1 avec les deux activités.

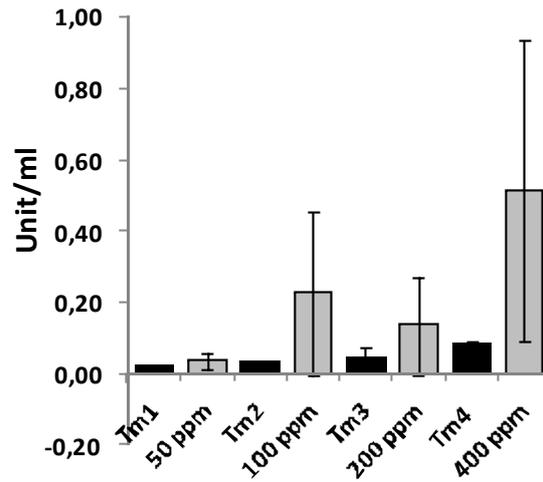
Les résultats montrent alors que l'activité de la superoxyde dismutase et la peroxydase appartenant directement ou indirectement au système de métabolisation ont une évolution conjointe d'allure similaire. Les légères variations d'activités chez les témoins peuvent s'expliquer par les variations de concentration de l'acétone incorporée au milieu de culture.

On note une augmentation de l'activité de SOD sous l'effet de toutes les molécules à différentes concentrations qui témoigne d'une prise en charge la production de radicaux libres ( $H_2O_2$ ). Par contre, il n'y a pas de réelle augmentation de l'activité SOD, il semble donc ne pas y avoir de métabolisation de phase 2 pour ce type de molécules (peut être une métabolisation de phase 1).

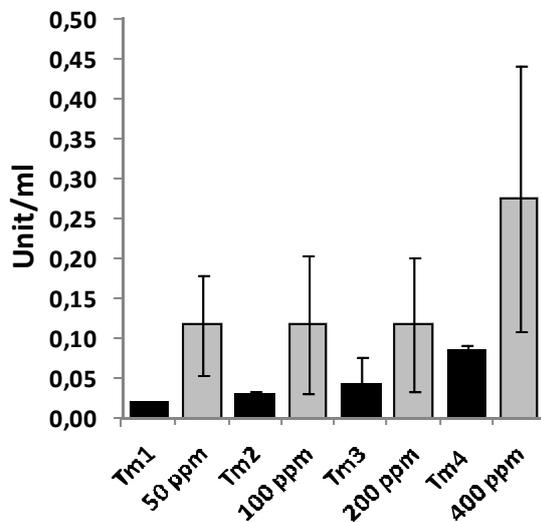
Il est remarquable de constater la nette stimulation de la peroxydase sous l'effet des molécules aux différentes concentrations. L'enzyme présente une forte activité relativement comparée avec l'activité de la superoxyde dismutase, mais seulement sous l'effet de ces molécules, cette activation est peut être due à l'augmentation de peroxyde d'hydrogène dans les filtrats de culture produit par la superoxyde dismutase, ce qui explique la forte activité de la peroxydase, dont son rôle de réduire peroxyde d'hydrogène, en effet, lorsque l'induction des enzymes antioxydantes est suffisante, elle permet l'adaptation des individus et le retour à la normale.



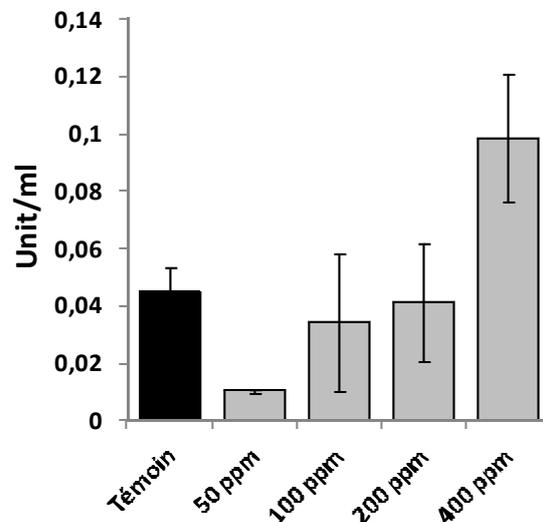
**Graphe 20:** Evaluation de l'influence de la molécule **Triazole 1<sup>ère</sup> série** (avec différentes concentrations) sur l'activité de la peroxydase dans le filtrat de culture de l'isolat KN1



**Graphe 22:** Evaluation de l'influence de la molécule **Triazole 2<sup>ème</sup> série** (avec différentes concentrations) sur l'activité de la peroxydase dans le filtrat de culture de l'isolat KN1



**Graphe 21:** Evaluation de l'influence de la molécule **khia** (avec différentes concentrations) sur l'activité de la peroxydase dans le filtrat de culture de l'isolat KN1



**Graphe 23:** Evaluation de l'influence de la molécule **Ammonium quaternaire** (avec différentes concentrations) sur l'activité de la peroxydase dans le filtrat de culture de l'isolat KN1

## 2) Discussion.

Les triazoles sont connus pour leurs larges spectres d'action vis-à-vis de nombreux champignons phytopathogènes. Dans cette étude nous avons testé *in-vitro* l'efficacité de 1,2,3-triazole et 1,2,4-triazole et ammonium quaternaire sur la croissance des de *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*. Lors de cet essai nous avons mesuré la croissance radiale et la production de biomasse sur milieu PDA, ces résultats révèlent de nets écarts entre les molécules testées.

D'une manière générale, toutes les substances testées pour leurs actions antifongiques, ont montré que pour certaines substances à faible concentration, la croissance mycélienne a été stoppée dès le 1<sup>er</sup> jour, par contre avec certaines molécules, nous avons noté de faible production de biomasse même avec de forte concentration.

Ces résultats nous ont permis d'enregistrer que la CI50 varie entre (0,002-2432,75 mg/ml) et la CI95 varie entre (0,054 – 4371126,08 mg/ml). Alors que d'autres travaux menés *in-vitro* par Capilla *et al*, 2001 ont évalué l'activité de nouvelles substances de triazoles par la méthode de microdillution vis-à-vis de *Fusarium solani* et *Scybalidium* que la CI90 égale 0,125 µg/ml ; par contre Paphitou *et al*, 2002 ont montré que les triazoles ont une forte activité contre 18 souches de *Fusarium solani* et 4 souches de *Fusarium oxysporum* CMI 50>64 µg/ml.

Espine, 2001 cinq souches d'*Aspergillus* et deux souches de *Fusarium* CMI 50>0.8µg/ml et Greer, 2003 *Aspergillus* et *Candida* (CMI 504 µg/ml). D'autres travaux d'Arikan *et al*, 2001 ont évalué la CMI 50de triazoles entre 0,5-0,63µg/ml contre cinq souches d'*Aspergillus* et 02 souches de *Fusarium*; Diekema *et al*, 2003, CI95 égale à ≤ 1 µg/ml vis-à-vis d'*Aspergillus* et *Fusarium*.

Les études menues *in vivo* par Molina *et al*, 2000 de nouvelles substances de triazoles contre *Trypanosoma cruzi* parasite responsable de la maladie Chagas. Paniagua *et al*, 2002 ont évalué l'effet de Triazole vis-à-vis de quatre-vingts *Candida albicans*, (0.25-8.0 µg/ml).

Les travaux de González *et al*, 2005 ont déterminé les activités inhibitrice *in-vitro* de trois nouveaux triazoles et ils les ont comparé avec d'itraconazole et fluconazole vis-à-vis de 306 isolats des champignons médicales, *Blastomyces dermatitidis*, *Cladophialophora carrionii*, *Coccidioides immitis*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Fusarium spp*, *Histoplasma capsulatum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Pseudallescheria boydii* et *Sporothrix schenckii*.

Les valeurs de l'activité inhibitrice *in-vitro* sont relativement uniformes vis-à-vis de *B. dermatitidis*, *C. carrionii*, *C. immitis*, *F. pedrosoi*, *H. capsulatum*, et *S. schenckii* de Itraconazole (MIC, 0.16-0.65 µgr/ml), voriconazole (MIC, 0.18-1.44 µgr/ml), ravuconazole (MIC, 0.18-1.09 µgr/ml) et posaconazole (MIC, 0.18-1.38 µgr/ml), par contre ces valeurs étaient variables avec les isolats de *P. boydii*, *P. lilacinus* et *Fusarium spp.*

(Espinell-Ingroff, 2001) a évalué les activités fongistatiques et fongicides *in-vitro* de voriconazole, itraconazole et amphotéricin B vis-à-vis de 260 (174 *Aspergillus sp*, 23 *Fusarium sp*, 6 *Paecilomyces lilacinus*, 6 *Rhizopus arrhizus*, 23 *Scedosporium sp*, 23 dermatophyte et 5 *Trichoderma longibrachiatum*), et il a montré la CI50 des fongicide vis-à-vis de *Fusarium spp.* (2 à > 8 microg/ml) et *Scedosporium prolificans* (> 8 microg/ml). Gumrukcuoglu *et al*, 2001 ont évalué une série de dérivées triazole vis-à-vis des bactéries, leurs résultats ont montré que les nouvelles dérivées bis-1,2,4-triazole synthétisées avaient un effet efficace antioxydant.

De plus, les activités du superoxyde dismutase enzymes antioxydatif, catalase, ascorbate-peroxidase et glutathione reductase ont été augmentées des deux fongicides aux taux maximaux de 16, 75, 51 et 144 %, respectivement. L'effet antioxydant de fongicides modernes largement utilisés dans la production céréalière intense dans beaucoup de pays représente un facteur important en évaluant des effets de pollution atmosphérique potentiels dans l'agriculture. La pertinence découvertes à la corrélation cellulaire d'enzymes peroxidatique et le superoxyde dismutase a été étudié par McMahon et Stern, 1979.

Le travail de Biagi *et al*, 1990 a fait le rapporte entre la synthèse de quelques dérivées 1,2,3-triazole et l'évaluation biologique, pour l'activité superoxyde dismutase, de ces nouveaux composés. Il a été montré que ces deux composés de triazole ont des effets profonds sur le métabolisme d'antioxydant et causé une augmentation dans les potentiels d'antioxydant tant non-enzymatiques qu'enzymatiques dans des traitements. Ces résultats suggèrent que, l'application de triazoles puisse être un outil utile pour augmenter la production d'antioxydant dans *S. rotundifolius* et de faire ainsi une culture vivrière économique (Kishorekumar *et al*, 2008).

**Conclusion :**

La variabilité morphologique chez dix sept isolats de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* de différentes origines géographiques, a été recherchée dans la descendance à partir de clones par isolement monospore. La première conclusion qu'il convient de tirer est que la morphologie des isolats étudiés du *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* est stable.

L'étude du pouvoir pathogène, des dix isolats de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*, a montré une variabilité pathologique qui varie d'un isolat à un autre, malgré l'éloignement géographique.

L'étude enzymatique in-vitro montre une nette influence de la source de carbone (pectine de citron et glucose) lors de dosage de la pectine méthylestérase (PME) et polygalacturonase (PGase) dans les filtrats de culture des isolats cultivés dans milieu czapeck qui contient 1% de ces substrats, les 10 isolats utilisés pour ce test ont produit ces enzymes et le degré de l'activité enzymatique varie d'un isolat à un autre, même pour les deux isolats qui n'appartiennent pas à la forme spéciale *albedinis* (*Foc* et *Fo*).

Nous avons noté que l'isolat hautement pathogène produit les deux types d'enzymes avec une activité plus importante, d'où l'idée de rechercher la corrélation entre le pouvoir pathogène et l'activité pectinolytique et les analyses statistiques ont montré une forte corrélation entre l'enzyme polygalacturonase et le pouvoir pathogène, chose que nous n'avons pas décelé avec la pectine méthylestérase.

A partir des résultats précédents, il nous a paru de suivre cette activité chez l'isolat potentiellement pathogène et produire le plus d'enzymes par rapport aux autres isolats utilisés dans ce test.

Le même constat que l'étude in vitro montre une nette influence de la source de carbone sur les activités enzymatiques. La sécrétion des pectinases est variable selon le milieu de culture et temps d'incubation.

D'après ces résultats préliminaires, il est souhaitable de poursuivre les travaux pour mieux comprendre l'interaction hôte-parasite, par des études enzymatiques et d'amplifier les facteurs qui influent cette activité enzymatique : temps d'incubation, gamme de température, différents pH, d'autre source de carbone (extrait de tissu du palmier dattier) et différents milieux de culture.

Ensuite, l'étude de ces enzymes après leurs purifications, et essayer la reproduction des symptômes, puis suivre la progression du pathogène in-vivo par des dosages et purification enzymatique, par des coupes cytologiques simple et ultrafine, et pour terminer mettre en évidence des gènes responsables de l'agressivité et les responsables de synthèse enzymatique.

L'utilisation des produits chimiques dans la lutte contre cette trachyomycose est un moyen sûr, rapide et efficace, dans cette étude nous avons pu déterminer la CI50 et CI95 de toutes les molécules tester, puis nous avons choisi une molécule des quatre séries, pour évaluer le stress oxydative, par dosage du superoxyde dismutase et peroxydase.

Les résultats de cette étude montre que certaines molécules, leurs CI50 et CI95 est très fine par rapport aux autres molécules, ces résultats encourageante ne permet pas d'affirmer leurs efficacité, il est souhaitable de continuer cette étude par d'autres test, et généralement dans ce cas des études, il faut préparer un dossier toxicologique très lourd vis-vis de l'utilisateur, la plantes, les animaux et l'environnement, pour introduire une nouvelle molécule au marché.

Les triazoles sont des substances inhibitrices de la synthèse d'ergostérol. Les champignons sont, en général, riche en ergostérol (24-méthylstérol). Plantes, vertébrés et champignons synthétisent leurs stérols, alors que les insectes doivent les procurer dans leur nourriture. Le rôle principal des stérols est d'entrer dans la constitution des membranes cellulaires dont ils contrôlent la perméabilité et la fluidité. Dans les prochaines études il est préférable d'évaluer l'inhibition de la synthèse d'ergostérol par dosage (HPLC) et d'étudier en détails le complexe oxydoréducteur.

- 1.** Adisa, V A et Fajola, AO., 1982 : Pectinolytic enzymes associated with the soft rots of *Citrus sinensis* caused by *Aspergillus aculeatus* et *Botryodiplodia theobromae*. *Myco pathologia* 77, 47-50.
- 2.** Agrios GN., 2005: *Plant Pathology*, 5th ed., Elsevier Academic Press, USA UK.
- 3.** Alcázar, DM., Egea, C., Espín, A et Candela, ME., 1995: Peroxidase isoenzymes in defence response of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiol Plant*, 94: 736-742.
- 4.** Alkorta, I., Garbisu, C., Liama, MJ et Serra, JL., 1998: Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process. Biochem*, 33(1: 21-28).
- 5.** Arib H., 1998: Isolement et caractérisation des *Fusarium oxysporum* f. sp *albedinis* de la Région de Beni Abbes. Mémoire pour l'obtention du Diplôme d'Ingénieur Institut d'Agronomie, Centre Universitaire de Mascara, Algérie.
- 6.** Arikan, S., Lozano-Chiu, M, Paetznick, V et Rex, JH., 2001 : In vitro susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* et *Fusarium* isolates. *Antimicrobial Agents Et Chemotherapy* 45 (1): 327-330.
- 7.** Armstrong, GM et Armstrong, JR., 1981: Forms specials and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. *Fusarium : diseases, biology and taxonomy*, Eds. States Univ. Press. Univ Park and London: 3 : 391-393.
- 8.** Armstrong, GM, Mac Lachlan, JD et Weindling, R., 1940: Variation in phyto-genicity and cultural characteristics of the cotton wilt organism, *Fusarium vasinfectum*. *Phytopathology*, pp. 515-520.
- 9.** Asada, K., 1992: Ascorbate peroxidase. A hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* 85, 235-241.
- 10.** Assigbetse, KB., 1989: Etude de la variabilité spontanée chez *Fusarium oxysporum* f. sp *vasinfectum* : agent causal de la fusariose du cotonnier. Mémoire D.E.A, Universités Paris XI, Paris VI, INAPG.
- 11.** Assigbetse, KB., 1993: Pouvoir Pathogène et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* f. sp *vasinfectum* (Atk) SN. Et H. : Agent de la fusariose du cotonnier. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier II, Paris, pp. 23-28.
- 12.** Auh, CK et Scandalios, JG., 1997: Spatial and temporal responses of the maize catalases to low temperature. *Physiol Plant*, 101:149-156.
- 13.** Baaziz, M., 2003: Contraintes biotiques et abiotiques de la culture du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Exemples relatifs aux pays du Maghreb. Laboratoire de Biochimie et Biotechnologies des Plantes, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences-Semlalia, Marrakech, Maroc.
- 14.** Ballio, A et Graniti, A., 1972: The origin of symptoms of vascular wilt diseases in phytotoxines. 17 : 289-294.
- 15.** Bastawade, KB., 1992: Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8: 353-368.
- 16.** Bateman, DF., 1976 : Hydrolitic et transeliminase degradation of pectic substances by extracellular enzymes of *Fusarium solani* f.sp.*phabeoli*, *Phytopathology*, 56, 238-244.

- 17.** Becana, M., Dalton, DA., Moran, JF., Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, MA et Rubio, MC., 2000: Reactive oxygen species and antioxidants in legume root nodules. *Physiol Plant* 109: 372–381.
- 18.** Biely, P., 1985 : Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology* 3: 286-290.
- 19.** Booth, C., 1971: the genus *Fusarium* Commonwealth, *Mycol. Inst. Kew, Surrey*, 237p.
- 20.** Booth, C., 1977: *Fusarium*. Laboratory guide to the identification of the major species. Commonwealth, *Mycol. Inst. Kew, England*, 58 p.
- 21.** Bouguedoura, N., 1979: Contribution à la connaissance du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. Etude des productions axillaires. Thèse de Doctorat troisième cycle, UST d'Alger.
- 22.** Bouhot, D et Billotte, JM., 1964: Studies on the ecology of parasitic fungi in the soil II Choise of a nutritive medium for the selective isolation of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* from the soil, *Ann. Epiphyt.*, 15 : 45-56.
- 23.** Bouhot, D., 1981: Some Aspects of the pathogenic Potential in formae special and races of *Fusarium oxysporum* on cucumbitaceae, in Nelson P. E., Toussoun T. A. et Cook R. J., Eds: *Fusarium* diseases, Biology and Taxonomy, Ch. 29, The Pen Sylvania State University Press, pp. 318 – 326.
- 24.** Bounaga, N et Djerbi, M., 2009: Pathologie du Palmier dattier, Unité de Recherche sur les Zones Arides. URZA (Algérie: Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, El Harrach (Algérie).
- 25.** Bounaga, N., 1970: Quelques aspects de la physiologie d'une souche de *Fusarium oxysporum* f. sp *albedinis*, agent de la maladie du bayoud. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord*, 60 : 137-163.
- 26.** Bounaga, N., 1991: Le Palmier Dattier, rappels biologiques et problèmes physiologique. In : Riedcker A., Dreyer E., Pafadnam C., Joly H. et Bory G., Eds), *Physiologie des Arbres et Arbustes en Zone Arides et Semi-Arides*, Groupe d'Etude de l'Arbre , John Libbey Eurotext, Paris, France, pp. 323-336.
- 27.** Bowler, C., Van Montagu, M et Inzé, D., 1992 : Superoxide Dismutase and stress tolérance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 43: 83-116.
- 28.** Brac de la Perrière, RA et Benkhalifa, A., 1989 : Identification des cultivars de dattier (*Phoenix dactylifera* L.) du Sud-ouest Algérien. *Bull. Ress. Gén. Vég.*, 78/79 : 13-19.
- 29.** Brett, C et Waldron, K., 1996: *Physiology et biochemistry of plant cell walls*, second edition. Chapman et Hall, New York.
- 30.** Brochard, P., Benzaza, S., Dubost, D et Hetener, P., 1970: Progression du bayoud en Algérie et résultats des prospections entreprises. In : *Congres d'agronomie Saharienne, Zagora*, avril 1970, 14 p. (MARA, Travaux sur le Bayoud).
- 31.** Bulit, J., Bouhot, D., Louvet, J et Toutain, G., 1967: Recherches sur les fusarioses, I. Travaux sur le bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier en Afrique du Nord. *Ann. Epiphyt.*, 18 : 213-239.
- 32.** Burgess, LW et Liddell, CM., 1983: *Laboratory Manual for Fusarium Research*. The

University of Sydney, Sydney, Australia.

- 33.** Burgess, LW., Nelson, PF et Summerell, BA., 1989: Variability and stability of morphological characters of *Fusarium oxysporum* isolated from soils in Australia. *Mycologia*, 81: 818-822.
- 34.** Cameron, RG., Luzio, GA., Goodner, K et Williams, MAK., 2008: Demethylation of a model homogalacturonan with a salt-independent pectin methylesterase from citrus: I. Effect of pH on demethylated block size, block number and enzyme mode of action. *Carbohydr. Polym.*, 71, 287-299.
- 35.** Capilla, J., Ortoneda, M, Pastor, FJ et Guarro, J., 2001: In Vitro Antifungal activities of the new triazole UR-9825 against Clinically Important filamentous fungi. *Antimicrobial Agents Et Chemotherapy* 45 (9) : 2635-2637.
- 36.** Carpenter, JB et Elmer, HS., 1978: Pest and diseases of the date palm. In : *Agriculture Handbook.*, Californie : U.S. date and citrus station, p. 42.
- 37.** Carpenter, JB et Klotz, LJ., 1966: Disease of the date palm. In : *Date Growers Inst Report*, 43: 15-21 (California).
- 38.** Corbaz, R., 1990: Principes de Phytopathologie et la lutte contre les maladies des plantes. *Press. Polytech. Univ. Rom.*, 1 : 38-53.
- 39.** Correll, JC., Puhalla, JE et Schneider, RW., 1986 **a**: Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp *apii* on the basis of colony size, virulence, and vegetative compatibility. *Phytopathol.*, 76: 396 – 400.
- 40.** Correll, JC., Puhalla, JE et Schneider, RW., 1986 **b**: Vegetative compatibility groups no pathogenic root colonizing strains of *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Bot.*, 64: 2358-2361.
- 41.** Dat, JF., Inze, D et Van Breusegem, F., 2001 : Catalase-deficient plants: Tools for in *Planta* studies on the role of hydrogen peroxide. *Redox Rep.* 6: 37-42.
- 42.** Denes, JM., Baron, A., Renard, CM., Pean, C et Drilleau, JF., 2000 : Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. *Carbohydr. Res.* 327, 385–393.
- 43.** Dickison, WC., 2000 : Integrative plant anatomy. Academic press. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Toronto, Sydney Tokyo.
- 44.** Diekema, DJ., Messer, SA., Hollis, RJ., Jones, RN et Pfaller, MA., 2003: Activities of caspofungin, itraconazole, Posaconazole, Ravuconazole, Voriconazole, et Amphotericin B against 448 recent clinical isolats of filamentous fungi. *Journal of Clinical Microbiology* 41(8) : 3623-3626.
- 45.** Dixon, GR., 1981: Vegetable crop Diseases. Mc. Millian, London, 337-377.
- 46.** Djerbi, M., 1988: Les maladies du palmier dattier. *Projet régional de lutte contre le Bayoud*, 84-18: pp. 127.
- 47.** Douaiher, MN., Nowak, E., Durand, R., Halama, P et Reignault, Ph., 2007: Correlative analysis of *Mycosphaerella graminicola* pathogenicity and cell wall-degrading enzymes produced *in vitro*: the importance of xylanase and polygalacturonase. *Plant Pathology.* 56:79–86.
- 48.** Drouhet, E et Dupont, B., 1983: Laboratory and clinical assessment of ketoconazole in

deep-seated mycoses. Amer. J. Med., 24: 30-47.

**49.** Dubost, D et Kada, A., 1974: Etude expérimentale de l'inoculation de jeunes plantules de palmier dattier par *Fusarium oxysporum*. Bull. Agro. Sahar., 1: 21-37.

**50.** Dumville, JC., et Fry, SC., 2000 : Uronic acid-containing oligosaccharins: their biosynthesis, degradation et signalling roles in non-diseased plant tissues. Plant Physiology et Biochemistry 38: 125-140.

**51.** El Moudafar, C et El Boustani, E., 2000: Relationship between cell wall susceptibility to cellulases and pectinases of *Fusarium oxysporum* and susceptibility of date palm cultivars. Biologia Plantarum 43 (4):571-576, 2000.

**52.** Espinel-Ingroff, A., 2001: In vitro fungal activities of voriconazole, Itraconazole, et Amphotericin B against Opportunistic Moniliaceous et Dermatiaceous Fungi. Journal of Clinical Microbiology 39(3): 954-958.

**53.** Favela-Torres, E., Volke-Sepúlveda, T et Vniegra-Gonzalez, G., 2006: Production of hydrolytic depolymerising pectinases. Food Technol. Biotechnol., 44(2): 221-227.

**54.** Fawcett, HS et Klotz, LJ., 1932 : Disease of the date palm. In : Ag. Exp. Sat., Bull no 522, pp. 1-47 (Uni. California).

**55.** Fernandez, D., Lourd, M., Ouinten, M., Tantaoui, A et Geige, JP., 1995: Le Bayoud du palmier dattier : Une maladie qui menace la phoeniciculture. Phytoma, La Défense des végétaux, (469): 36-39.

**56.** Follin, JC et Laville, E., 1966: Variations chez le *Fusarium oxysporum* f. sp *cubense* (Agent causal de la maladie de Panama du Bananier) : Comportement des lignées issues des différents organes de multiplication. Fruits, 21: 529-537.

**57.** Garanti, L et Molteni, G., 2003: MeOPEG-bounded azide cycloadditions to alkynyl dipolarophilles. Tetrahedron Letters 44: 1133-1135.

**58.** García-Limones, C., Hervás, A., Navas-Cortés, JA., Jiménez-Daíz, RM et Tena, M., 2002: Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Physiol Mol Plant Pathol, 61:325–337.

**59.** Gäumann, E., 1957: Influence de la nutrition du fer sur la sensibilité des plantes de tomates en vers la *Lycomara sanium*.

**60.** Gay, PA et Tuzun, S., 2000: Temporal and spatial assessment of defence responses in resistant and susceptible cabbage varieties during infection with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Physiol Mol Plant Pathol, 57: 201–210.

**61.** Gonzalez-Lamothe, R., Tsitsigiannis, DI., Ludwig, AA., Panicot, M., Shirasu, K et Jones, JDG., 2006: The U-Box protein CMPG1 is required for efficient activation of defense mechanisms triggered by multiple resistance genes in tobacco and tomato. Plant Cell, 18: 1067-1083.

**62.** Greer, ND., 2003: Voriconazole : the newest triazole antifungal agent. BUMC Proceedings 16 : 241-248.

**63.** Guan, LM et Scandalios, JG., 2000: Hydrogen-peroxide-mediated catalase gene

expression in response to wounding. *Free Radical Biol Medicine*, 28: 1182–1190.

- 64.** Hamoir, J., Goret, M., Mignon, B et Gustin, P., 2001 : Actualité sur les antifongiques enregistrés en Belgique dans le cadre du traitement des dermatophytoses chez les carnivores domestiques. *Ann.Méd.Vét.* 145 : 226-232.
- 65.** Henni, JE., 1998: Morphologie, pouvoir pathogène et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*. Thèse de doctorat d'Etat en science de la nature, Option phytopathologie.
- 66.** Henni, JE., Boisson, C et Geiger JP., 1994: Variabilité du pouvoir pathogène chez *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercisi*. *Phytopathol. Medit.*, 33: 10-16.
- 67.** Henni, JE., Boisson, C et Geiger, JP., 1994: Variabilité de la morphologie chez *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercisi*. *Phytopathol. Medit.*, 33: 51-58.
- 68.** Henni, JE., Fortas, Z et Geiger, JP., 1998: Etude de la compatibilité végétative chez des souches de *Fusarium oxysporum* isolées dans la région Ouest de l'Algérie. *Phytopathol. Medit.*, 37, 69 – 74.
- 69.** Hislop, EC., 1993: Application technology for Crop protection: An introduction. *CAB Int*, UK, pp. 3-11.
- 70.** Hokkanen, HMT et Lynche, JM., 1995: Biological control Benefits and Risks. *Cambridge University Press*, p. 304.
- 71.** Horsfall, JG et Dimond, AE., 1960: Plant pathology Anadvanced Trealise. New York-London.
- 72.** Huisman, MMH., Schols, HECTAR et Voragen, AGJ., 2000: Glucuronoarabinoxylan from maize kernel cell walls are more complex than those from Sorghum kernel cell walls. *Carbohydrate Polymers* 43: 269-279.
- 73.** Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S. et Doe, CQ., 2001: Drosophila neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell* 106, 511–521.
- 74.** Jayani, RS., Saxena, S et Gupta, R., 2005: Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem.*, 40, 2931-2944.
- 75.** Jervis, M et Kidd, N., 1996: Insect Natural Enemies, practical approaches to their study and evaluation. *Chapman and Hall*, New York, p.491.
- 76.** Jones, JP et Woltz, SS., 1981: *Fusarium* incited diseases of tomato and potato and their control. Basis for a diseases control system in *Fusarium* diseases, *biology and taxonomy*, 340-349.
- 77.** Karkachi, N., 2002: Conditions physico-chimiques de croissance et contribution à la lutte chimique vis-à-vis *Fusarium oxysporum*. Thèse de Magister Université d'Oran, pp. 30-32.
- 78.** Karr, AL et Albersheim, B., 1970: Polysaccharide degrading enzymes are unable to attack plant cell walls without prior action by a « wall modifying enzymes » *Plant Physiol.* 46, 69-80.

- 79.** Koulla, L et Saaidi, M., 1985: Etude du rôle des inflorescences et de fruits du palmier dattier dans la dissémination du Bayoud. Séminaire National sur l'Agronomie Saharienne, INRA, Marrakech, pp. 67-70.
- 80.** Kwon, SI et Anderson, AJ., 2001 : Differential production of superoxide dismutase and catalase isozymes during infection of wheat by *Fusarium proliferatum*-like fungal isolate. *Physiol Mol Plant Pathol*, 58:73–81.
- 81.** Lalaoui, F., Halamaa, P., Dumortiera, V et Paul, B., 2000: Cell wall-degrading enzymes produced in vitro by isolates of *Phaeosphaeria nodorum* differing in aggressiveness. *Plant Pathology*. 49: 727-733.
- 82.** Laville, E., 1970: Principes et méthodes de sélection des palmiers dattiers résistant aux maladies fongiques. *El Awamia*, 35: 123-127.
- 83.** Laville, E., 1973: Les maladies du dattier. 95-108. In : Munier P., Le palmier dattier. Paris : Maisonneuve et Larose, 221 p.
- 84.** Leberre, M., 1978 : Mise au point sur le problème du ver de la datte *Myelois ceratoniae* Zell. *Bull. Agr. Sabar.*, 1(41): 1-35.
- 85.** Lemanceau, P et Alabouvette C., 1993: Suppression of *Fusarium* wilt by *Pseudomonas fluorescens*. Mechanisms and application. *Biocontrol science and technology*. Ch: 3, 234-291.
- 86.** Lewis WJ., Vet, LEM., Tumlinson, JH., Van Lenteren, JC et Papaj, DR., 1990: Variations in parasitoid foraging behavior : essential element of a sound biological control theory, *Env. Ento.*, 19(05): 1183-1193.
- 87.** Louvet, J., 1977: Observations sur la localisation des chlamydospores de *Fusarium oxysporum* dans les tissus des plantes parasitées. INRA, Paris, 193-197.
- 88.** Maire, R et Malençon, G., 1933: Le Belâat, Nouvelle Maladie du Dattier dans le Sahara Algérien. *C. Rend. Acad. Sciences*, CXVI. 21 : 1567-1569.
- 89.** Malençon, G., 1947: Mission d'étude dans les oasis du territoire d'Ain-Safra et de l'annexe du Tidikelt concernant une maladie du palmier dattier. *Ann. Agr. Alg.*, 2: 139-158.
- 90.** Matamoros, MA., Dalton, DA., Ramos, J., Clemente, MR., Rubio, MC et Becana, M., 2003: Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiol* 133: 499–509
- 91.** McMahon, S et Stern, A., 1979: in *Molecular Diseases*, eds. Schewe, T. & Rapoport, S. (Pergamon, New York), pp. 41-46.
- 92.** Messaoudi, H et Messaoudi, L., 1989: Etude phytopathologique, morphologique et physiologique de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*. Mémoire pour l'obtention du D.E.S.
- 93.** Messiaen, CM et Cassini, R., 1968: Recherches sur les Fusarioses. IV – La systématique des *Fusarium*. *Ann. Epiph.*, 19): 387-454.
- 94.** Messiaen, CM., Blancard, D., Rouxel, F et Lafon, R., 1991: les maladies des plantes maraîchères. Edition INRA. Paris.
- 95.** Metcalf, RL et Luckman, WH., 1994: Introduction to insect pest management. *Wiley Interscience*, New York, p. 650.
- 96.** Mhadhbi, H., Jebara, M., Limam, F et Aouani, ME., 2004: Rhizobial strain involvement in

plant growth, nodule protein composition and antioxidant enzyme activities of chickpea-rhizobia symbioses: modulation by salt stress. *Plant Physiol Biochem*, 42: 717-722.

**97.** Mittler, R., Lam, E., Shulaev, V et Cohen, M., 1999: Signal controlling the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during pathogen induced programmed cell death in tobacco. *Plant Mol Biol*, 39: 1025–1035.

**98.** Molina, J., Martins-Filho, O., Brener, Z., Romanha, J.A., Lebenberg, D et Urbina, J.A., 2000 : Activities of the triazole Derivative SCH 56892 (Posaconazole) against drug-resistant strains of the Protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent et immunosuppressed Murine Hosts. *Antimicrobial Agents Et Chemotherapy* 44(1) : 150-155.

**99.** Monk, S.L., Fagerstedt, K.V et Crawford, R.M.M., 1989: Oxygen toxicity and Superoxide Dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiol Plant*, 76: 456-459.

**100.** Montaigne, D.M et Fall, A.M., 1986: La protection sanitaire des palmeraies en Mauritanie. *Phytoma*, 9: 41-45.

**101.** Mourichon X., 2003: Informations nécessaires à l'Analyse du Risque Phytosanitaire (ARP) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* pour les zones Antilles. CIRAD, pp. 10.

**102.** Munier, P., 1973: Le Palmier dattier, Paris : Maisonneuve et Larose, pp 15-72.

**103.** Nelson, P.E., 1981: Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. *Fungal wilt diseases plan. Acad. Press*, 51-78.

**104.** Nelson, P.E., Tousson, T.A et Cook R.K.J., 1981: *Fusarium*. Diseases, Biology and Taxonomy. *Penn. Stat. Univ. Press.*, 457 p.

**105.** Nelson, P.E., Tousson, T.A et Marasas, W.F., 1983: *Fusarium* species. An illustrated manuel for identification. *Penn. Stat. Univer. Press.*, 193 p.

**106.** Nelson, P.E., Tousson, T.A., et Marasas, W.F.O., 1983 : *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press.

**107.** Ould El Hadj, M.D ; Bitour, Z; Siboukeur, O., 2006 : Etude de la production de levure boulangère (*Saccharomyces cerevisiae*) cultivée sur mout de rebuts de dattes. *Courrier du Savoir – N°07, Décembre 2006*, pp.13-18.

**108.** Paniagu, A., Monroy, G.L.C., Negrete, E.P et Vaca, S.P., 2002: Susceptibility to 5-Fluorocytosine, miconazole et amphotericin B of *Candida albicans* strains isolated from throat of non-AIDS patients. *Rev Latinoam Microbiol* 44 (2) :65-68. Armstrong, G.M et Armstrong, J.K., 1975 : Reflections on the wilt fusaria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 13:95-103.

**109.** Paphitou, N.I., Ostrosky-Zeichner, L., Paetznick, V.L., Rodriguez, J.R, Chen, E et Rex, H.J., 2002: In vitro activities of investigational Triazoles against *Fusarium* Species : Effects of Inoculum Size et Incubation Time on Broth Microdilution susceptibility Test Results. *Antimicrobial Agents Et Chemotherapy.* 46(10) : 3298-3300.

**110.** Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M.A., Barcelo, A.R., Medina, M.I., Alonso, F.J., de Forchetti, S.M., Tigier, H et Valpuesta, V., 2000 : A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol*, 122: 1119-1127.

**111.** Reignault, R., Valette-Collet, O et Boccara, M., 2008: The importance of fungal

pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 33, 245–247.

**112.** Rieuf, P., 1970 : Champignons parasites identifiés au Maroc sur *Phoenix dactylifera* L. Congrès Maghrébin d'Agronomie Saharienne.

**113.** Ruzsa, SM., Mylona, P et Scandalios, JG., 1999: Differential response of antioxidant genes in maize leaves exposed to ozone. *Redox Rep*, 4: 95-103.

**114.** Saaidi, M., 1979: Contribution à la lutte contre le Bayoud. Fusariose vasculaire du palmier dattier. Thèse de Doctorat d'Université, Université de Dijon, 140 p.

**115.** Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J et Vandamme, EJ., 1993: Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.*, 39, 213-279.

**116.** Salama, M et Mishriky, AG., 1987: A study of the toxic activity of *Fusarium moniliforme* shield. *J. Bot.*, 29/30(01/03): 31/46.

**117.** Scandalios, JG., Guan, L et Polidords, AN., 1997: Catalases in plants: gene structure, proprieties and expression. Scandalios J.G. (ed) Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defences. Cold Spring Laboratory Press. Cold Spring Harbor NY, 1997, pp. 343-406.

**118.** Semal, J., 1989: Traité de Pathologie végétale. Les presses agronomiques de Gembloux, A.S.B.L. Belgique.

**119.** Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabouta, Y et Yoshimura K., 2002: Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot*, 53: 1305-1319.

**120.** Takrouni, L., Rhouma, A., Khoualdia, O et Allouchi, B., 1988: Observations préliminaires sur deux graves maladies d'origine inconnue du Palmier dattier en Tunisie. INRA, Tunisie, 61: 2-16.

**121.** Tantaoui, A., 1989: Contribution à l'étude de l'écologie du *Fusarium oxysporum* f. sp *albedinis* agent causal du bayoud. Densité et répartition de l'inoculum au sein du peuplement fusarien. D.E.S., Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc.

**122.** Tantaoui, A., Quinten, M., Geiger, JP et Fernandez, D., 1996: characterization of a signale clonal lineage of *Fusarium oxysporum* f. sp *albedinis* causing Bayoud disease of date palm in Morocco. *Phytopathol.*, 86(07): pp. 787.

**123.** Vandenabeele, S., Vanderauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidilitz, HK., Zabeau, M., Van Montagu, M., Inzé, D et Van Breusegem, V., 2004: Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 39:45-58.

**124.** Vilardebo, A., 1973: Principaux parasites de la datte et du dattier. Le Palmier dattier. Paris : Maisonneuve et Larose, pp. 67-95.

**125.** Vilardebo, A., 1975: Enquête diagnostic sur les problèmes phytosanitaires entomologiques dans les palmeraies du Sud-Est Algérien. In : *Bull. Agron. Sahar.*, 01 (03): 1-27.

**126.** Vincent, C et Coderre, D., 1992: La lutte biologique. *Gaëtan Morin Editeur* (Montréal:

*Lavoisier Tech. Doc.*, Paris: p. 671.

**127.** Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D et Van Camp, W., 1997: Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress in C3 plants. *EMBO J*, 16: 4806–4816.

**128.** Yang, T et Poovaiah, BW., 2002: Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 4097-4102.

**129.** Yoshida, S., Tsuyumu, S., Tsukiboshi, T., 2003: Macerating Enzymes Produced by *Rhizopus oryzae* in Infected Mulberry Roots. *J. Phytopathology*. 151: 436–441.

**130.** Zhang, L., Zhang, A., Chen X., Lei, X., Nan, X., Chen, D et Zhang, Z., 2002 : Synthesis et Biological Activity of 3-(2-Furanyl)-6-Aryl-1,2,4-Triazolo[3,4-b]-1,3,4-Thiadiazoles. *Molecules* 2002, 7, 681-689.

## ***Annexe 01***

## 1) Milieu pommes de terre :

Pomme de terre	200 gr
Dextrose	20 gr
Agar	20 gr
H <sub>2</sub> O	1000 ml

## 2) Milieu Czapeck :

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 gr
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,5 gr
KCl	0,5 gr
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,01 gr
NaNO <sub>3</sub>	2 gr
Saccharose	20 gr
Agar	20 gr
H <sub>2</sub> O	1000 ml

## 3) Milieu SNA

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 gr
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,5 gr
KCl	0,5 gr
KNO <sub>3</sub>	1 gr
Sucrose	0,2 gr
Glucose	0,2 gr
Agar	20 gr
H <sub>2</sub> O	1000 ml

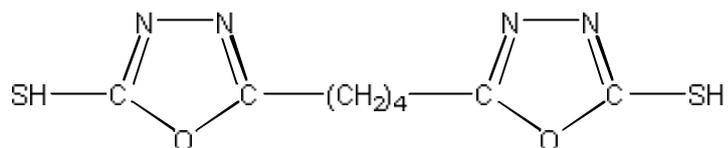
## 4) Gélose 2%

Agar	2 gr
H <sub>2</sub> O	100 ml

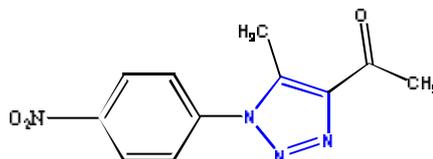
## ***Annexe 02***

Code	Structure
Kia1	$\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$ <p><b>Acide 1,6-hexanedioïque ou Acide adipique</b></p>
Kia2	$\text{C}_2\text{H}_5-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_5$ <p><b>1,6-hexanedioate d'éthyle (adipate de diéthyle)</b></p>
Kia3	$\text{H}_2\text{N}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{NH}_2$ <p><b>Dihydraside adipique</b></p>
Kia4	$\text{NH}_2-\overset{\text{S}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2$ <p><b>1,4-thiosemicarbazide butane</b></p>
Kia5	$\text{SH}-\text{C}_4\text{H}_3\text{N}_3-\text{C}_4\text{H}_3\text{N}_3-\text{SH}$ <p><b>bis-(4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazol-3-yl)butane</b></p>
Kia6	$\text{SH}-\text{C}_4\text{H}_3\text{N}_3-\text{C}_4\text{H}_3\text{N}_3-\text{SH}$ <p><b>Bis(5-mercapto-4H-1,2,4-triazol-3-yl)butane</b></p>

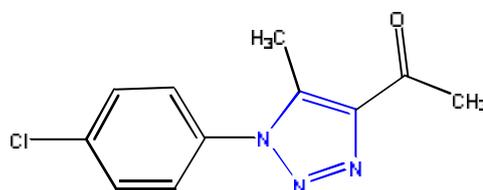
Kia7

**Bis(5-mercapto-1,3,4-oxadiazol-2-yl)butane**

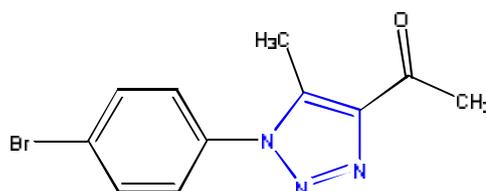
Zg1



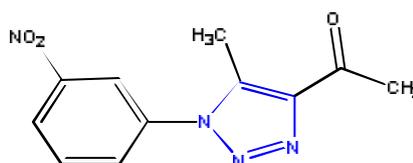
Zg2



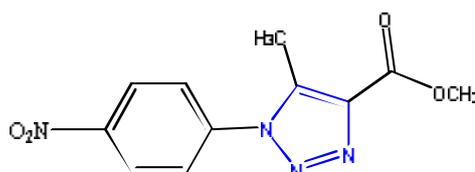
Zg3



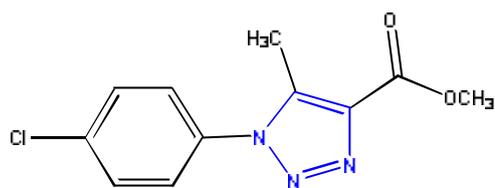
Zg4



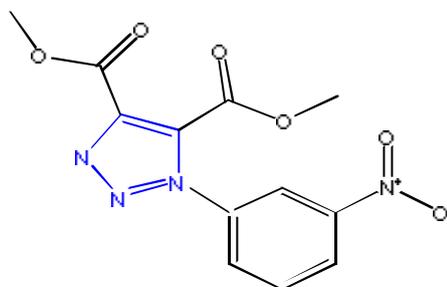
Zg5



Zg6

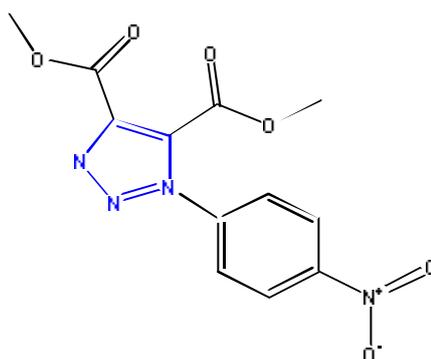


M1



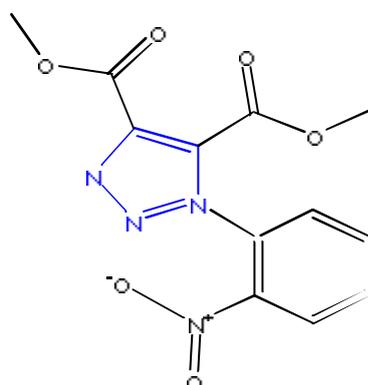
dimethyl 1-(3-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4,5-dicarboxylate

M2



dimethyl 1-(4-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4,5-dicarboxylate

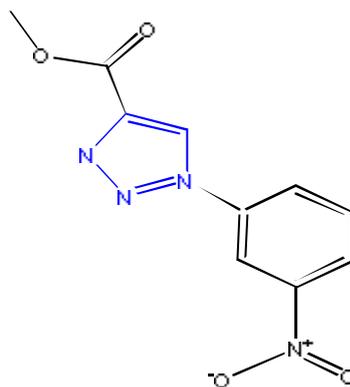
M3



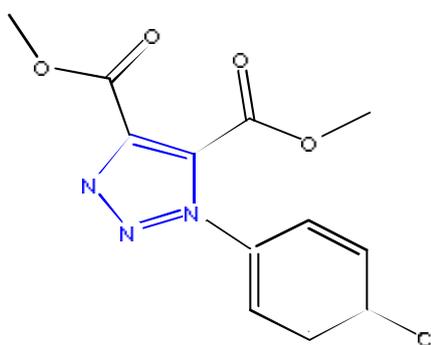
dimethyl 1-(2-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4,5-dicarboxylate

Clicours.COM

M4

**methyl 1-(3-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4,5-dicarboxylate**

M5

**dimethyl 1-(2-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4,5-dicarboxylate**

**Caractères physico-chimiques des molécules traizoles**

Code	T <sub>f</sub> °C	Solvant	Aspect physique
Zg1	14	Acétone	Solide jaune
Zg2	11	Acétone	Solide jaune clair
Zg3	116	Acétone	Solide blanc
Zg4	118	Acétone	Solide jaune
Zg5	170	Acétone	Solide jaune
Zg6	188	Acétone	Solide jaune clair
Zg7	200	Acétone	Solide blanc
M1	115	Acétone	Solide marron
M2	178	Acétone	Solide blanc
M3	147	Acétone	Solide blanc
M4	135	Acétone	Solide jaune
M5	111	Acétone	Solide marron
Kia1	152	Acétone	Poudre cristalline blanche
Kia2		Acétone	huile incolore
Kia3	179	Acétone	solide blanc (aspect coton)
Kia4		Acétone	Cristaux blanc
Kia5	178	Acétone	poudre jaune
Kia6	149	Acétone	poudre cristalline jaune
Kia7	172	Acétone	poudre jaune

## ***Annexe 03***

**Tableau 01 : Valeurs du poids frais de la biomasse mycélienne (gr) de l'isolat KN1 traité par la molécule Kia5 à différentes concentrations**

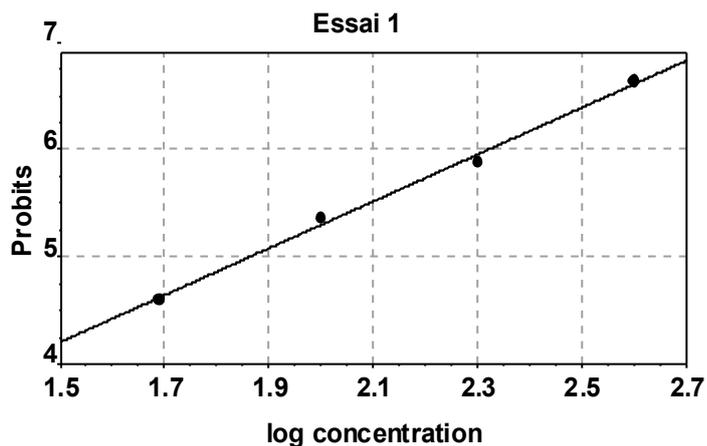
Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Témoin de 50	2,3	1,1	1,7
50	1,5	0,7	1,1
Témoin de 100	2,2	1,2	1,7
100	0,8	0,59	0,59
Témoin de 200	2,1	1,5	1,8
200	0,4	0,5	0,5
Témoin de 400	1,9	1,8	1,85
400	0,1	0,3	0,3

**Tableau 02 : Pourcentage d'inhibition (P %) de la biomasse mycélienne de l'isolat KN1 traité par la molécule Kia5 à différentes concentration**

Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
50	34,78	36,36	35,29
100	63,63	50,83	65,29
200	80,95	66,66	72,22
400	94,73	83,33	83,78

**Tableau 03 : Transformation des pourcentages d'inhibition en probits**

Log concentration	Essai 1		Essai 2		Essai 3	
	(P %)	probits	(P %)	probits	(P %)	probits
1,69	34,78	4,61	36,36	4,67	35,29	4,64
2	63,64	5,36	50,83	5,03	65,29	5,41
2,3	80,95	5,88	66,67	5,44	72,22	5,61
2,6	94,74	6,64	83,33	5,99	83,78	5,99



1. Equation de la droite de régression

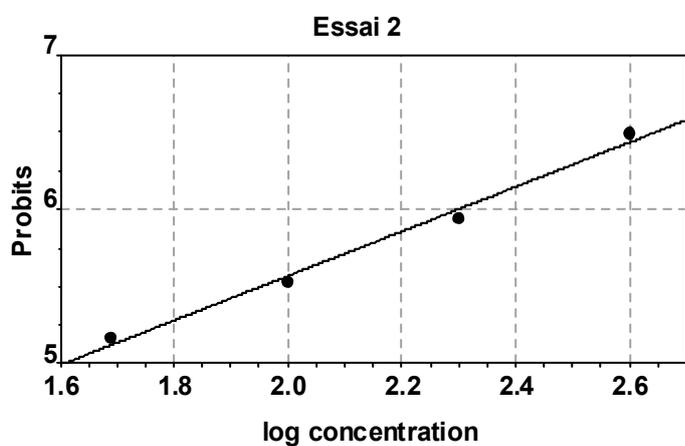
$$Y = 2,18 x + 0,93.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,99$$

3. Erreur standard

$$e = 0,071$$



1. Equation de la droite de régression

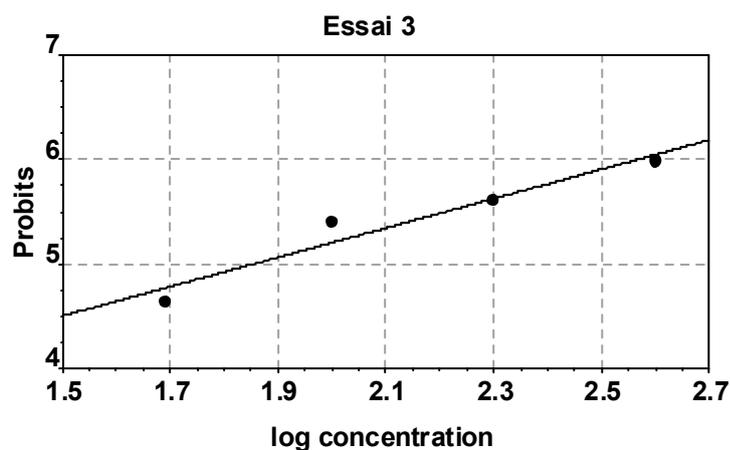
$$Y = 1,44 x + 2,18.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,99$$

3. Erreur standard

$$e = 0,07$$



1. Equation de la droite de régression

$$Y = 1,4 x + 2,39.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,96$$

3. Erreur standard

$$e = 0,17$$

Données graphiques relatives aux essais réalisés avec la molécule Kia5

**Tableau 04 : Valeurs du poids frais de la biomasse mycélienne (gr) de l'isolat KN1 traité par la molécule Kia1 à différentes concentrations**

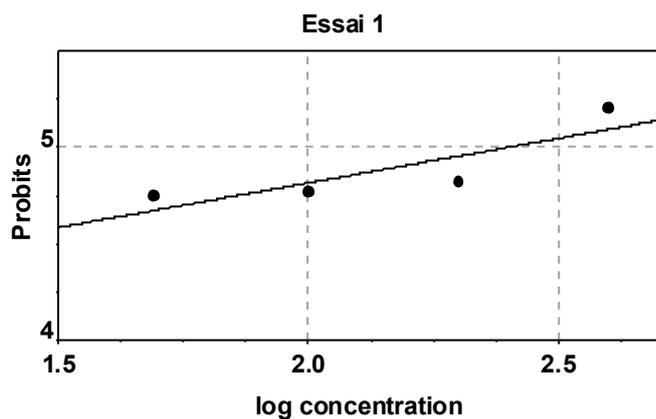
Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Témoin de 50	2,3	1,1	1,7
50	1,4	0,73	1
Témoin de 100	2,2	1,2	1,7
100	1,3	0,61	0,9
Témoin de 200	2,1	1,5	1,8
200	1,2	0,57	0,85
Témoin de 400	1,9	1,8	1,85
400	0,8	0,54	0,7

**Tableau 05 : Pourcentage d'inhibition (P %) de la biomasse mycélienne de l'isolat KN1 traité par la molécule Kia1 à différentes concentration**

Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
50	39,13	33,64	41,18
100	40,91	49,17	47,06
200	42,86	62,00	52,78
400	57,89	70,00	62,16

**Tableau 06 : Transformation des pourcentages d'inhibition en probits**

Log concentration	Essai 1		Essai 2		Essai 3	
	(P %)	probits	(P %)	probits	(P %)	probits
1,69	39,13	4,75	33,64	4,59	41,18	4,80
2	40,91	4,77	49,17	5	47,06	4,92
2,3	42,86	4,82	62	5,31	52,78	5,08
2,6	57,89	5,2	70	5,52	62,16	5,31



1. Equation de la droite de régression

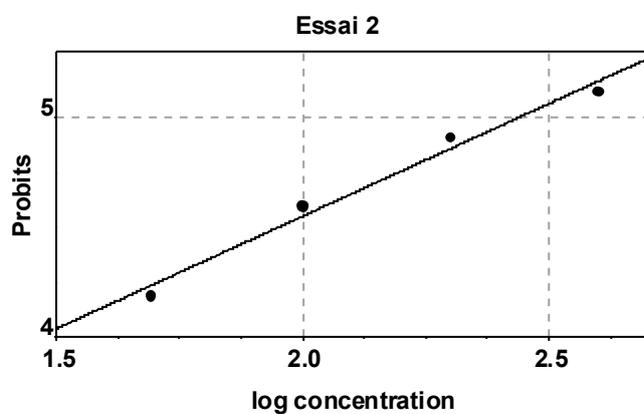
$$Y = 0,46 x + 3,89.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,84$$

3. Erreur standard

$$e = 0,13$$



1. Equation de la droite de régression

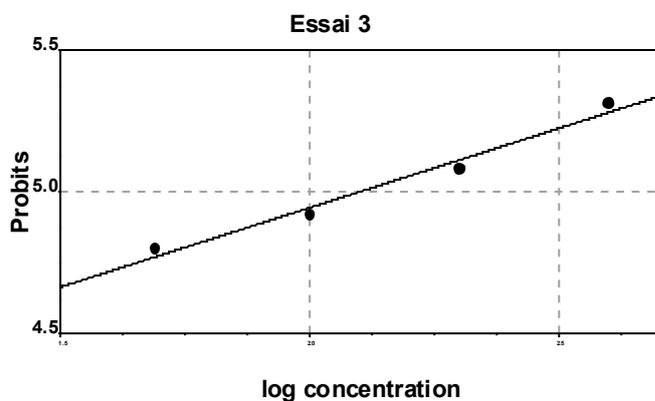
$$Y = 1,02 x + 2,9.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,99$$

3. Erreur standard

$$e = 0,67$$



1. Equation de la droite de régression

$$Y = 0,55 x + 3,83.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,98$$

3. Erreur standard

$$e = 0,041$$

**Donnés graphiques relatives aux essais réalisés avec la molécule Kia1**

**Tableau 07 : Valeurs du poids frais de la biomasse mycélienne (gr) de l'isolat KN1 traité par la molécule Kia2 à différentes concentrations**

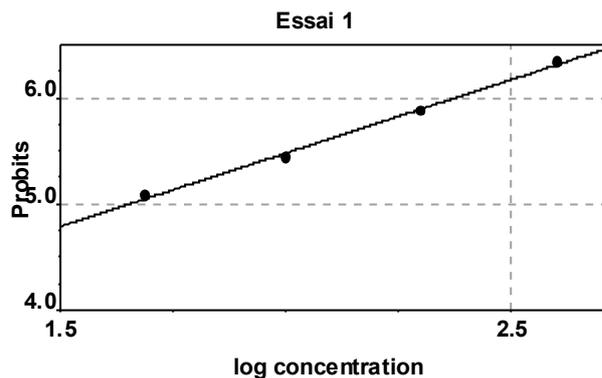
Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Témoin de 50	2,1	1,1	1,7
50	1	0,5	0,74
Témoin de 100	2,1	1,2	1,8
100	0,7	0,4	0,6
Témoin de 200	2,1	1,5	1,8
200	0,4	0,2	0,2
Témoin de 400	2,1	1,8	1,7
400	0,2	0,1	0,1

**Tableau 08 : Pourcentage d'inhibition (P %) de la biomasse mycélienne de l'isolat KN1 traité par la molécule Kia2 à différentes concentration**

Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
50	52,38	54,55	56,47
100	66,67	66,67	66,67
200	80,95	86,67	88,89
400	90,48	94,44	94,12

**Tableau 09 : Transformation des pourcentages d'inhibition en probits**

Log concentration	Essai 1		Essai 2		Essai 3	
	(P %)	probits	(P %)	probits	(P %)	probits
1,69	52,38	5,08	54,55	5,13	56,47	5,18
2	66,67	5,44	66,67	5,41	66,67	5,41
2,3	80,95	5,88	86,67	6,13	89,19	6,28
2,6	90,48	6,34	94,44	6,64	94,12	6,64



- Equation de la droite de régression

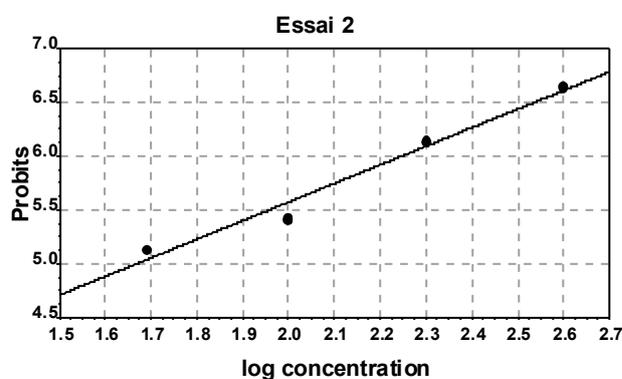
$$Y = 1,39 x + 2,69.$$

- Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,99$$

- Erreur standard

$$e = 0,041$$



- Equation de la droite de régression

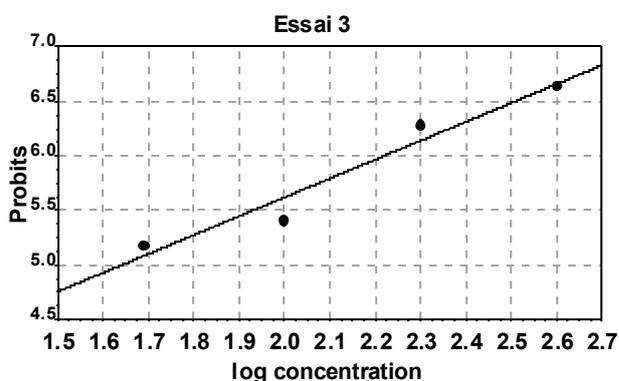
$$Y = 1,73 x + 2,11.$$

- Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,98$$

- Erreur standard

$$e = 0,13$$



- Equation de la droite de régression

$$Y = 1,73 x + 2,11.$$

- Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,97$$

- Erreur standard

$$e = 0,19$$

Données graphiques relatives aux essais réalisés avec la molécule Kia2

**Tableau 10 : Valeurs du poids frais de la biomasse mycélienne (gr) de l'isolat KN1 traité par la molécule Kia7 à différentes concentrations**

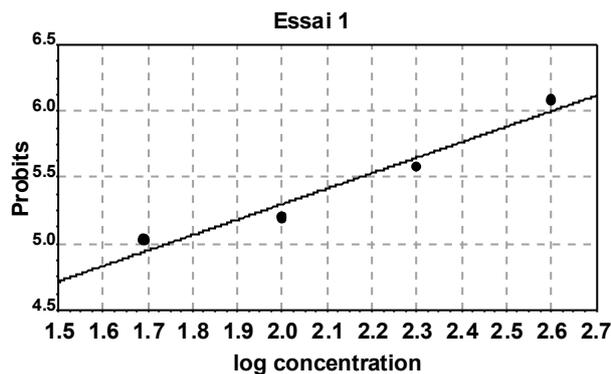
Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Témoin de 50	2,1	1,1	1,7
50	1,03	0,5	0,89
Témoin de 100	2,1	1,2	1,8
100	0,9	0,4	0,79
Témoin de 200	2,1	1,5	1,8
200	0,6	0,3	0,5
Témoin de 400	2,1	1,8	1,7
400	0,3	0,2	0,3

**Tableau 11 : Pourcentage d'inhibition (P %) de la biomasse mycélienne de l'isolat KN1 traité par la molécule Kia7 à différentes concentration**

Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
50	50,95	54,55	47,65
100	57,14	66,67	56,11
200	71,43	80,00	72,22
400	85,71	88,89	82,35

**Tableau 12 : Transformation des pourcentages d'inhibition en probits**

Log concentration	Essai 1		Essai 2		Essai 3	
	(P %)	probits	(P %)	probits	(P %)	probits
1.69	50,95	5,03	54,55	5,13	50,56	5,03
2	57,14	5,2	66,67	5,44	57,3	5,20
2,3	71,13	5,58	80	5,84	70,59	5,55
2,6	85,71	6,08	88,89	6,23	82,35	5,95



1. Equation de la droite de régression

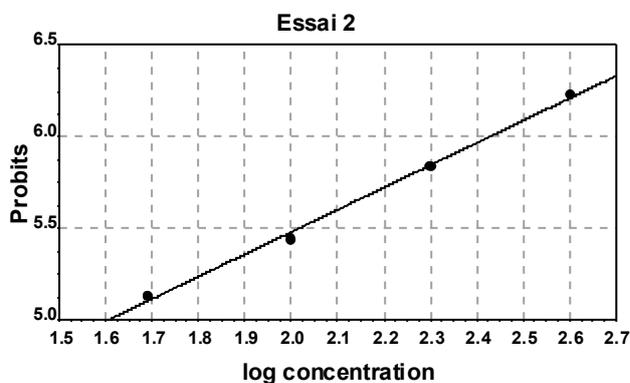
$$Y = 1,16 x + 2,97.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,97$$

3. Erreur standard

$$e = 0,12$$



1. Equation de la droite de régression

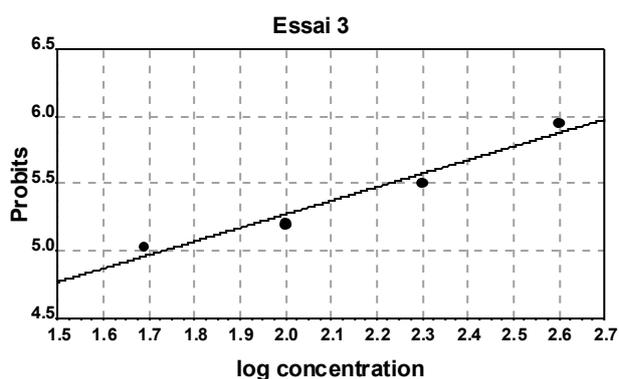
$$Y = 1,22 x + 3,03.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,99$$

3. Erreur standard

$$e = 0,037$$



1. Equation de la droite de régression

$$Y = x + 3,25.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,97$$

3. Erreur standard

$$e = 0,1$$

Données graphiques relatives aux essais réalisés avec la molécule Kia7

**Tableau 16 : Valeurs du poids frais de la biomasse mycélienne (gr) de l'isolat KN1 traité par la molécule Kia3 à différentes concentrations**

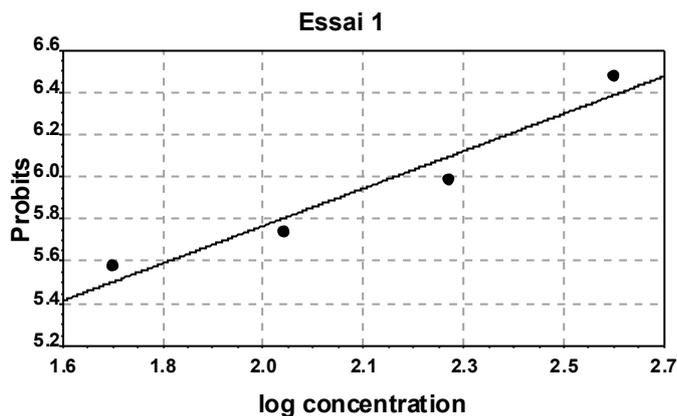
Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Témoin de 50	2,1	1,1	1,7
50	0,6	0,22	0,2
Témoin de 100	2,1	1,2	1,7
100	0,5	0,19	0,17
Témoin de 200	2,1	1,5	1,8
200	0,35	0,15	0,13
Témoin de 400	2,1	1,8	1,9
400	0,15	0,11	0,1

**Tableau 17 : Pourcentage d'inhibition (P %) de la biomasse mycélienne de l'isolat KN1 traité par la molécule Kia3 à différentes concentration**

Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
50	71,43	80,00	88,24
100	76,19	84,17	90,00
200	83,33	90,00	92,78
400	92,86	93,89	94,74

**Tableau 18 : Transformation des pourcentages d'inhibition en probits**

Log concentration	Essai 1		Essai 2		Essai 3	
	(P %)	probits	(P %)	probits	(P %)	probits
1.69	71,43	5,52	80	5,84	88,24	6,18
2	76,19	5,71	84,17	5,99	90	6,28
2,3	83,33	5,99	90	6,28	92,78	6,48
2,6	92,86	6,48	93,89	6,55	94,74	6,64



1. Equation de la droite de régression

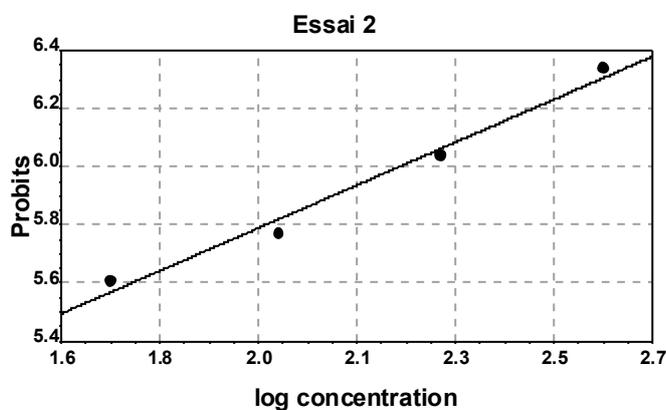
$$Y = 1,04 x + 3,68.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,97$$

3. Erreur standard

$$e = 0,11$$



1. Equation de la droite de régression

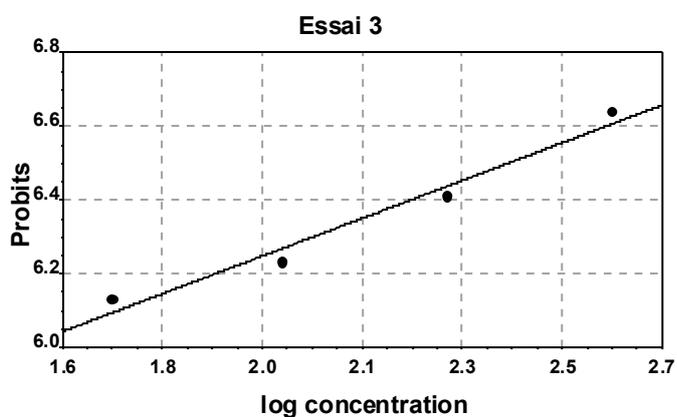
$$Y = 0,79 x + 4,45.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,99$$

3. Erreur standard

$$e = 0,052$$



1. Equation de la droite de régression

$$Y = 0,52 x + 5,27.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,98$$

3. Erreur standard

$$e = 0,032$$

Données graphiques relatives aux essais réalisés avec la molécule Kia3

**Tableau 19 : Valeurs du poids frais de la biomasse mycélienne (gr) de l'isolat KN1 traité par la molécule Kia4 à différentes concentrations**

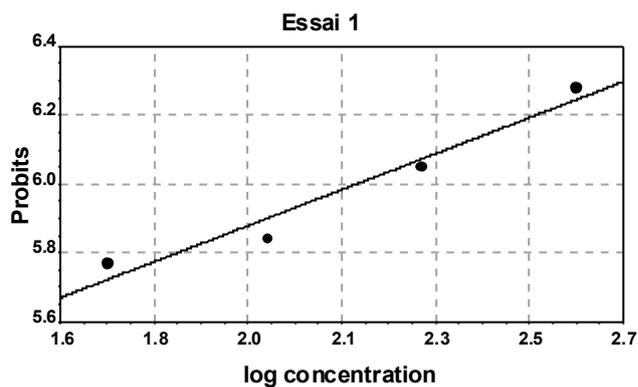
Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Témoin de 50	2,1	1,1	1,7
50	0,5	0,21	0,17
Témoin de 100	2,1	1,2	1,8
100	0,42	0,19	0,13
Témoin de 200	2,1	1,5	1,8
200	0,31	0,15	0,15
Témoin de 400	2,1	1,8	1,7
400	0,23	0,09	0,09

**Tableau 20 : Pourcentage d'inhibition (P %) de la biomasse mycélienne de l'isolat KN1 traité par la molécule Kia4 à différentes concentration**

Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
50	76,19	80,91	90,00
100	80,00	84,17	92,78
200	85,24	90,00	91,67
400	89,05	95,00	94,71

**Tableau 21 : Transformation des pourcentages d'inhibition en probits**

Log concentration	Essai 1		Essai 2		Essai 3	
	(P %)	probits	(P %)	probits	(P %)	probits
1.69	77,27	5,77	80,91	5,88	80,56	5,88
2	80	5,84	84,17	6,04	83,78	5,99
2,3	85,24	6,05	90	6,28	87,65	6,18
2,6	89,05	6,28	95	6,645	92,35	6,48



1. Equation de la droite de régression

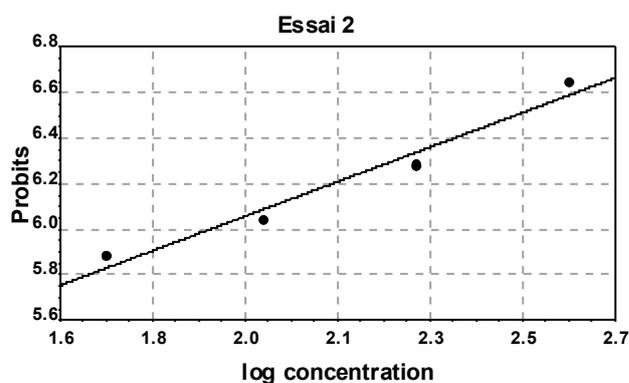
$$Y = 0,57 x + 4,75.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,97$$

3. Erreur standard

$$e = 0,06$$



1. Equation de la droite de régression

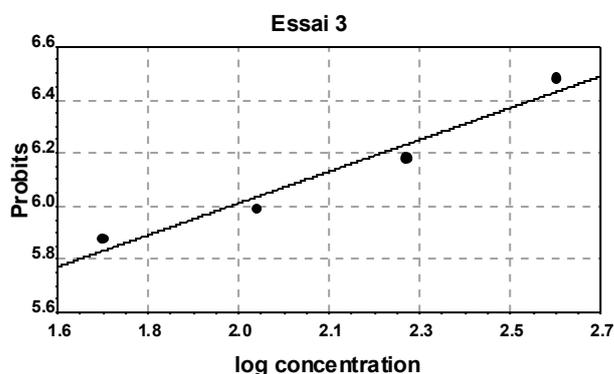
$$Y = 0,83 x + 4,41.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,98$$

3. Erreur standard

$$e = 0,075$$



1. Equation de la droite de régression

$$Y = 0,65 x + 4,41.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,97$$

3. Erreur standard

$$e = 0,069$$

Données graphiques relatives aux essais réalisés avec la molécule Kia4

**Tableau 22 : Valeurs du poids frais de la biomasse mycélienne (gr) de l'isolat KN1 traité par la molécule Kia6 à différentes concentrations**

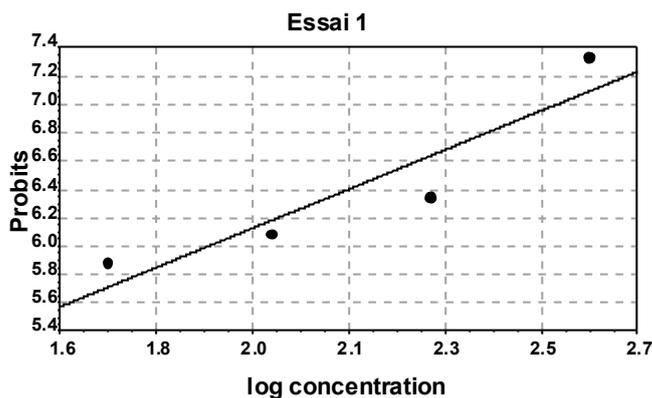
Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Témoin de 50	2,1	1,1	1,7
50	0,4	0,15	0,15
Témoin de 100	2,1	1,2	1,8
100	0,3	0,11	0,11
Témoin de 200	2,1	1,5	1,8
200	0,2	0,1	0,14
Témoin de 400	2,1	1,8	1,7
400	0	0,07	0,07

**Tableau 23 : Pourcentage d'inhibition (P %) de la biomasse mycélienne de l'isolat KN1 traité par la molécule Kia6 à différentes concentration**

Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
50	80,95	86,36	91,18
100	85,71	90,83	93,89
200	90,48	93,33	92,22
400	100,00	96,11	95,88

**Tableau 24 : Transformation des pourcentages d'inhibition en probits**

Log concentration	Essai 1		Essai 2		Essai 3	
	(P %)	probits	(P %)	probits	(P %)	probits
1.69	80,95	5,88	81,25	5,92	80,56	5,88
2	85,71	6,08	87,06	6,13	83,78	5,99
2,3	90,48	6,34	90	6,28	87,65	6,18
2,6	100	7,33	94,17	6,55	92,35	6,48



1. Equation de la droite de régression

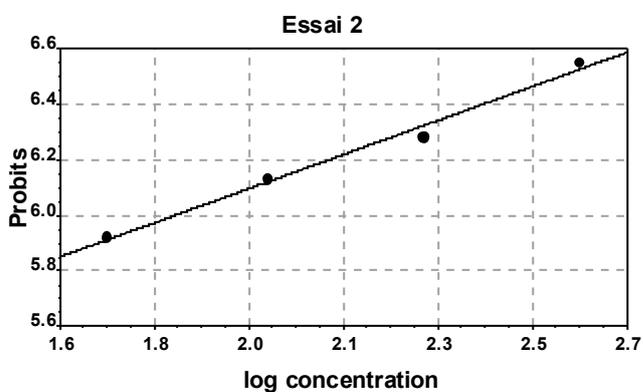
$$Y = 1,51 x + 3,14.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,92$$

3. Erreur standard

$$e = 0,3$$



1. Equation de la droite de régression

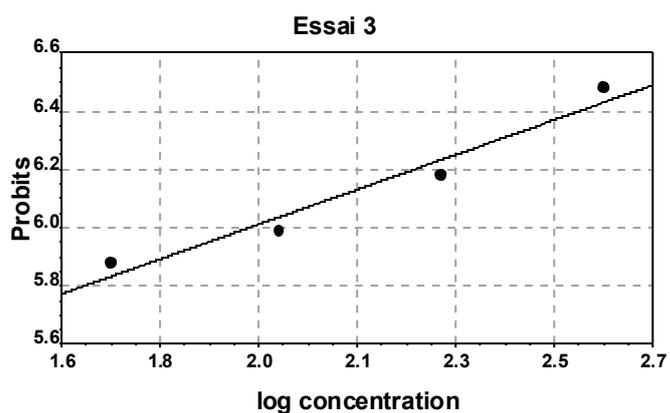
$$Y = 0,67 x + 4,77.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,99$$

3. Erreur standard

$$e = 0,036$$



1. Equation de la droite de régression

$$Y = 0,65 x + 4,72.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,97$$

3. Erreur standard

$$e = 0,06$$

Donnés graphiques relatives aux essais réalisés avec la molécule Kia6

**Tableau 25 : Valeurs du diamètre (cm) de la croissance radiale du mycélium de l'isolat KN1 traité par la molécule Zg1 à différentes concentrations**

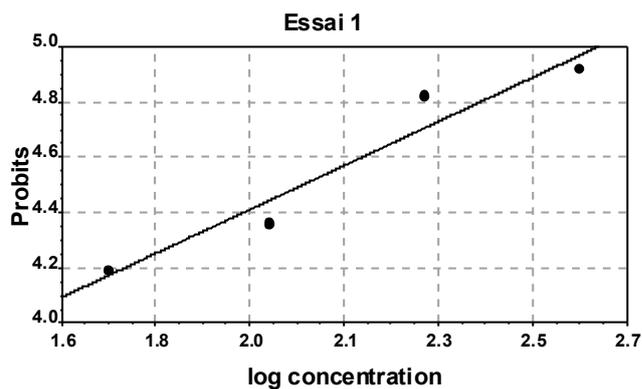
Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
0	5,3	5,4	5,2
50	4,2	4,2	4,1
100	3,9	4	3,5
200	3	3,4	3,3
400	2,8	2,5	2,8

**Tableau 26 : Pourcentage d'inhibition (P %) de la biomasse mycélienne de l'isolat KN1 traité par la molécule Zg1 à différentes concentration**

Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
50	20,75	22,22	21,15
100	26,42	25,93	32,69
200	43,40	37,04	36,54
400	47,17	53,70	46,15

**Tableau 27 : Transformation des pourcentages d'inhibition en probits**

Log concentration	Essai 1		Essai 2		Essai 3	
	(P %)	probits	(P %)	probits	(P %)	probits
1.69	20,75	4,19	22,22	4,23	21,15	4,19
2	26,42	4,36	25,93	4,36	32,69	4,56
2,3	43,40	4,82	37,04	4,67	36,54	4,67
2,6	47,17	4,92	53,70	5,10	46,15	4,90



1. Equation de la droite de régression

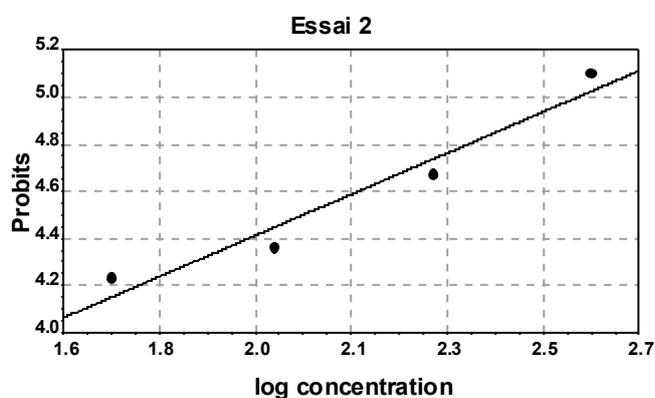
$$Y = 0,87 x + 2,69.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,96$$

3. Erreur standard

$$e = 0,1$$



1. Equation de la droite de régression

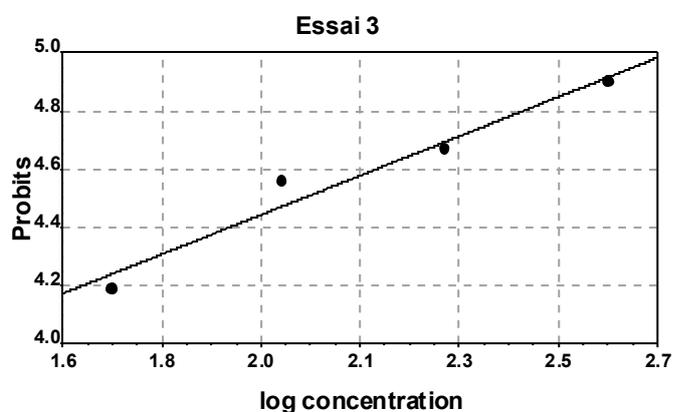
$$Y = 0,96 x + 2,52.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,97$$

3. Erreur standard

$$e = 0,11$$



1. Equation de la droite de régression

$$Y = 0,74 x + 2,98.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,97$$

3. Erreur standard

$$e = 0,07$$

Données graphiques relatives aux essais réalisés avec la molécule Zg1

**Tableau 28 : Valeurs du diamètre (cm) de la croissance radiale du mycélium de l'isolat KN1 traité par la molécule Zg2 à différentes concentrations**

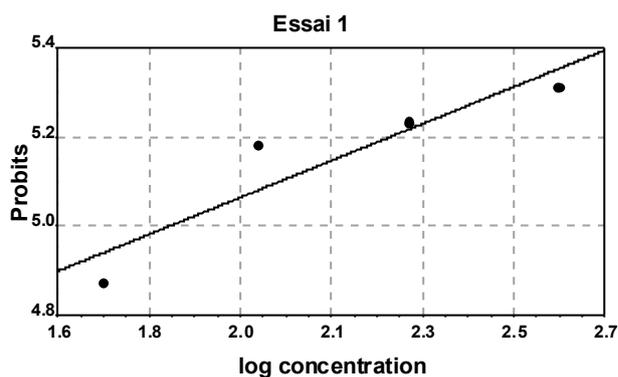
Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
0	5,3	5,4	5,2
50	2,9	3,3	3,5
100	2,3	2,8	2,7
200	2,1	2,4	2,15
400	2	2	1,9

**Tableau 29 : Pourcentage d'inhibition (P %) de la biomasse mycélienne de l'isolat KN1 traité par la molécule Zg2 à différentes concentration**

Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
50	45,28	38,89	32,69
100	56,60	48,15	48,08
200	60,38	55,56	58,65
400	62,26	62,96	63,46

**Tableau 30 : Transformation des pourcentages d'inhibition en probits**

Log concentration	Essai 1		Essai 2		Essai 3	
	(P %)	probits	(P %)	probits	(P %)	probits
1.69	45,28	4,87	38,89	4,72	32,69	4,56
2	56,60	5,18	48,15	4,95	48,08	4,95
2,3	59,43	5,23	55,56	5,15	58,65	5,23
2,6	62,26	5,31	62,96	5,33	63,46	5,33



1. Equation de la droite de régression

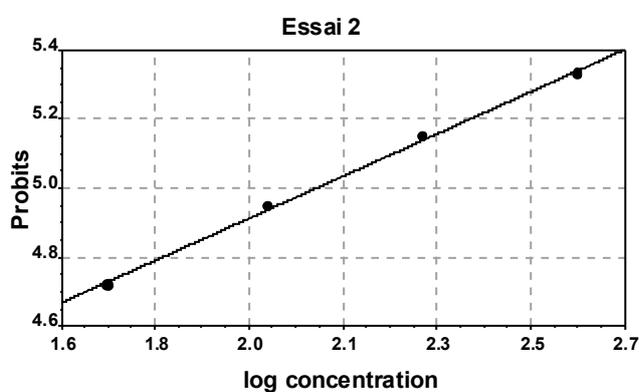
$$Y = 0,45 x + 4,17.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,92$$

3. Erreur standard

$$e = 0,09$$



1. Equation de la droite de régression

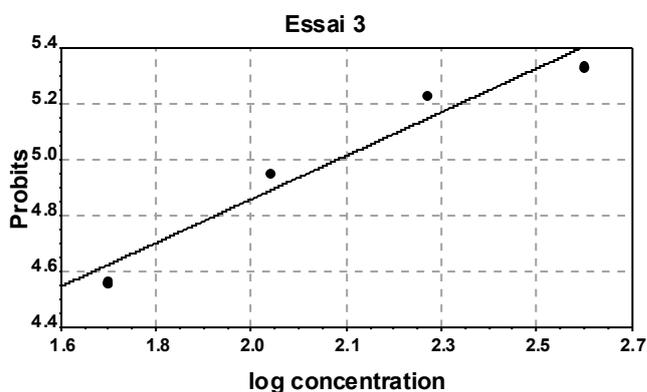
$$Y = 0,67 x + 3,59.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,99$$

3. Erreur standard

$$e = 0,01$$



1. Equation de la droite de régression

$$Y = 0,85 x + 3,17.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,97$$

3. Erreur standard

$$e = 0,01$$

Données graphiques relatives aux essais réalisés avec la molécule Zg2

**Tableau 31 : Valeurs du diamètre (cm) de la croissance radiale du mycélium de l'isolat KN1 traité par la molécule Zg3 à différentes concentrations**

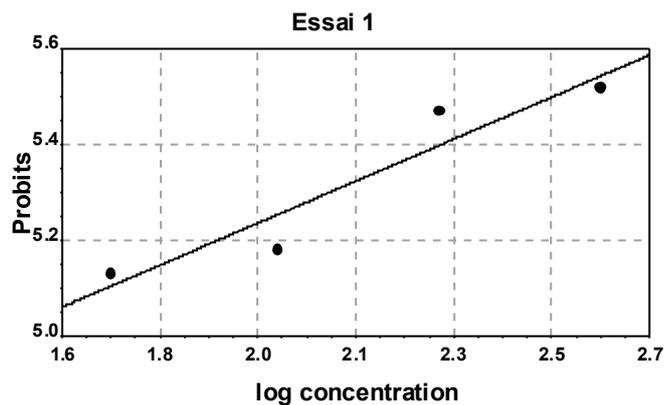
Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
0	5,3	5,4	5,2
50	2,4	2,8	2,9
100	2,3	2,1	2,3
200	2,2	2	1,7
400	1,6	1,4	1,5

**Tableau 32 : Pourcentage d'inhibition (P %) de la biomasse mycélienne de l'isolat KN1 traité par la molécule Zg3 à différentes concentration**

Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
50	54,72	48,15	44,23
100	56,60	61,11	55,77
200	58,49	62,96	67,31
400	69,81	74,07	71,15

**Tableau 33 : Transformation des pourcentages d'inhibition en probits**

Log concentration	Essai 1		Essai 2		Essai 3	
	(P %)	probits	(P %)	probits	(P %)	probits
1,69	54,72	5,13	48,15	4,95	44,23	4,85
2	56,60	5,18	61,11	5,28	55,77	5,15
2,3	67,92	5,47	62,96	5,33	67,31	5,44
2,6	69,81	5,52	74,07	5,64	71,15	5,55



1. Equation de la droite de régression

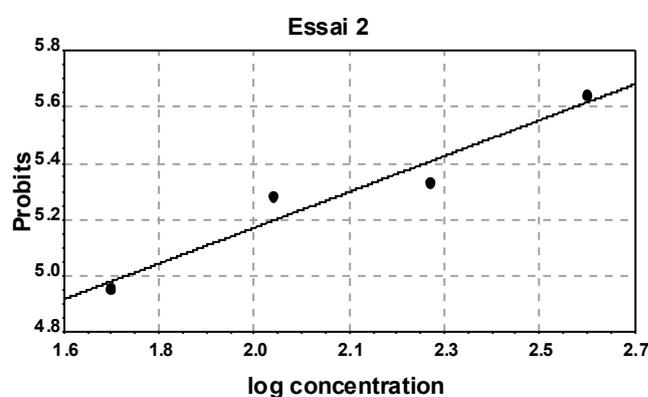
$$Y = 0,48 x + 4,29.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,94$$

3. Erreur standard

$$e = 0,07$$



1. Equation de la droite de régression

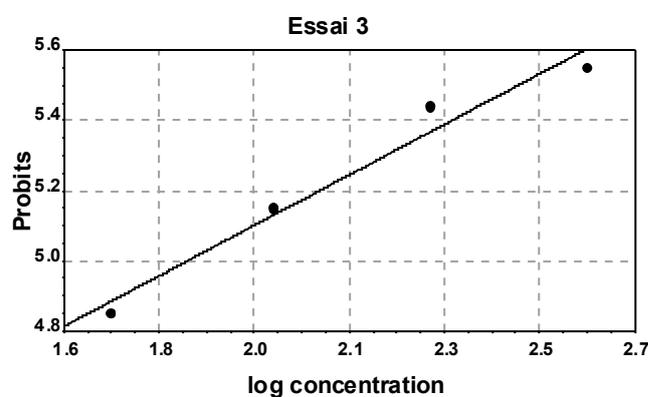
$$Y = 0,7 x + 3,79.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,96$$

3. Erreur standard

$$e = 0,08$$



1. Equation de la droite de régression

$$Y = 0,78 x + 3,55.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,98$$

3. Erreur standard

$$e = 0,7$$

Données graphiques relatives aux essais réalisés avec la molécule Zg3

**Tableau 34 : Valeurs du diamètre (cm) de la croissance radiale du mycélium de l'isolat KN1 traité par la molécule Zg4 à différentes concentrations**

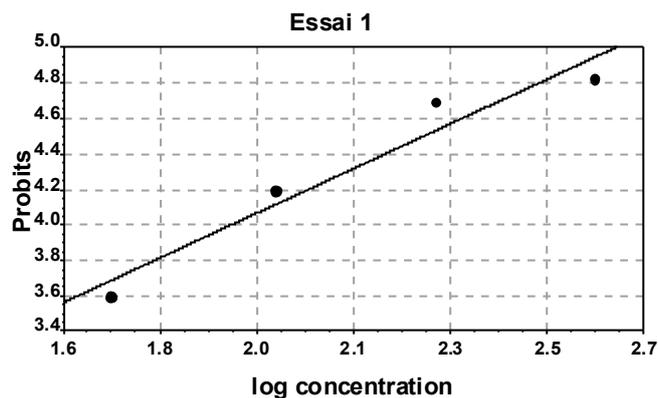
Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
0	5,3	5,4	5,2
50	4,9	4,7	4,8
100	4,2	4,1	4,3
200	3,3	3,6	3,9
400	3	3,3	3,2

**Tableau 35 : Pourcentage d'inhibition (P %) de la biomasse mycélienne de l'isolat KN1 traité par la molécule Zg4 à différentes concentration**

Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
50	7,55	12,96	7,69
100	20,75	24,07	17,31
200	37,74	33,33	25,00
400	43,40	38,89	38,46

**Tableau 36 : Transformation des pourcentages d'inhibition en probits**

Log concentration	Essai 1		Essai 2		Essai 3	
	(P %)	probits	(P %)	probits	(P %)	probits
1,69	7,55	3,59	12,96	3,82	7,69	3,59
2	20,75	4,19	24,07	4,33	17,31	4,08
2,3	37,74	4,69	33,33	4,56	25,00	4,33
2,6	43,40	4,82	38,89	4,72	38,46	4,69



- Equation de la droite de régression

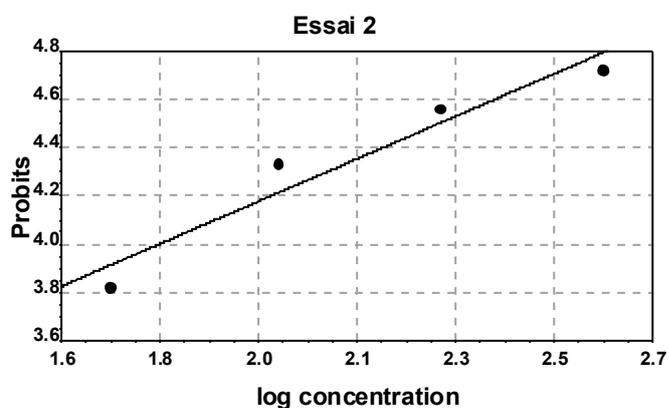
$$Y = 1,38 x + 1,34.$$

- Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,96$$

- Erreur standard

$$e = 0,16$$



- Equation de la droite de régression

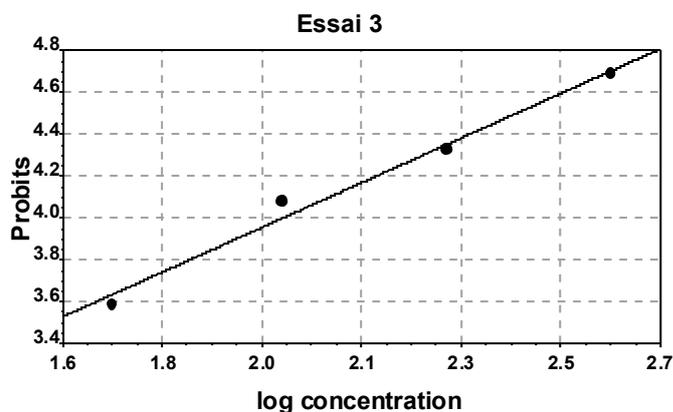
$$Y = 0,96 x + 2,27.$$

- Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,96$$

- Erreur standard

$$e = 0,12$$



- Equation de la droite de régression

$$Y = 1,17 x + 1,65.$$

- Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,99$$

- Erreur standard

$$e = 0,06$$

Données graphiques relatives aux essais réalisés avec la molécule Zg4

**Tableau 37 : Valeurs du diamètre (cm) de la croissance radiale du mycélium de l'isolat KN1 traité par la molécule Zg5 à différentes concentrations**

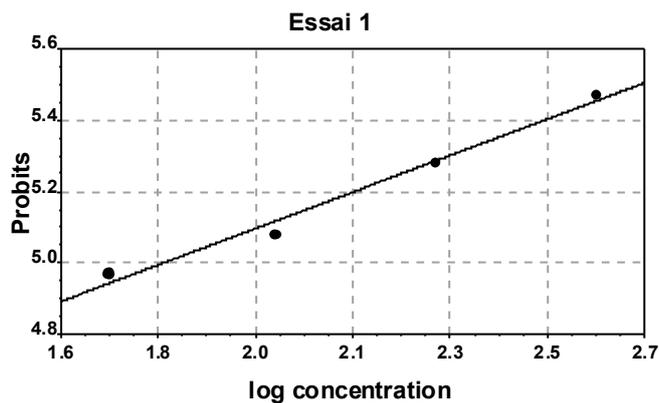
Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
0	5,3	5,4	5,2
50	2,7	3,2	2,5
100	2,5	2,1	2,3
200	2,4	2	2,05
400	1,7	1,65	1,75

**Tableau 38 : Pourcentage d'inhibition (P %) de la biomasse mycélienne de l'isolat KN1 traité par la molécule Zg5 à différentes concentration**

Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
50	49,06	40,74	51,92
100	52,83	61,11	55,77
200	54,72	62,96	60,58
400	67,92	69,44	66,35

**Tableau 39 : Transformation des pourcentages d'inhibition en probits**

Log concentration	Essai 1		Essai 2		Essai 3	
	(P %)	probits	(P %)	probits	(P %)	probits
1,69	49,06	4,97	40,74	4,77	51,92	5,05
2	52,83	5,08	61,11	5,28	55,77	5,15
2,3	61,32	5,28	62,96	5,33	60,58	5,28
2,6	67,92	5,47	69,44	5,52	66,35	5,41



1. Equation de la droite de régression

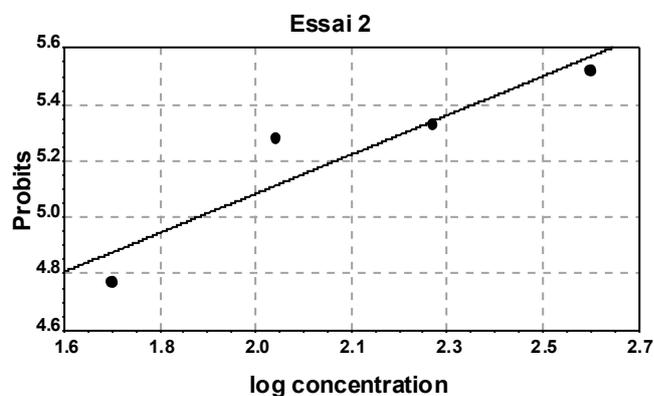
$$Y = 0,56 x + 3,99.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,99$$

3. Erreur standard

$$e = 0,03$$



1. Equation de la droite de régression

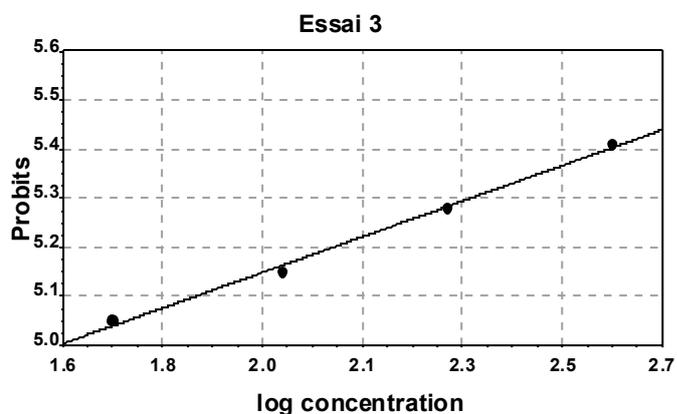
$$Y = 0,76 x + 3,58.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,92$$

3. Erreur standard

$$e = 0,14$$



1. Equation de la droite de régression

$$Y = 0,39 x + 4,36.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,99$$

3. Erreur standard

$$e = 0,01$$

Données graphiques relatives aux essais réalisés avec la molécule Zg5

**Tableau 40 : Valeurs du diamètre (cm) de la croissance radiale du mycélium de l'isolat KN1 traité par la molécule Zg6 à différentes concentrations**

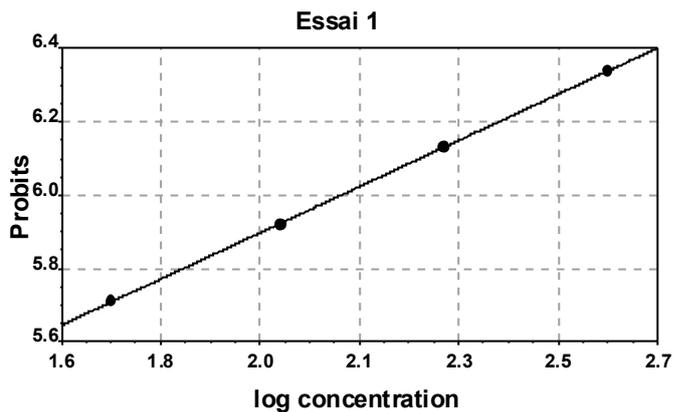
Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
0	5,3	5,4	5,2
50	1,3	1,4	1,8
100	1	1,1	1
200	0,7	0,9	0,7
400	0,5	0,4	0,5

**Tableau 41 : Pourcentage d'inhibition (P %) de la biomasse mycélienne de l'isolat KN1 traité par la molécule Zg6 à différentes concentration**

Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
50	75,47	74,07	65,38
100	81,13	79,63	80,77
200	86,79	83,33	86,54
400	90,57	92,59	90,38

**Tableau 42 : Transformation des pourcentages d'inhibition en probits**

Log concentration	Essai 1		Essai 2		Essai 3	
	(P %)	probits	(P %)	probits	(P %)	probits
1.69	75,47	5,71	75,00	5,67	65,38	5,41
2	81,13	5,92	79,63	5,84	81,73	5,92
2,3	86,79	6,13	83,33	5,99	86,54	6,13
2,6	90,57	6,34	92,59	6,48	90,38	6,34



1. Equation de la droite de régression

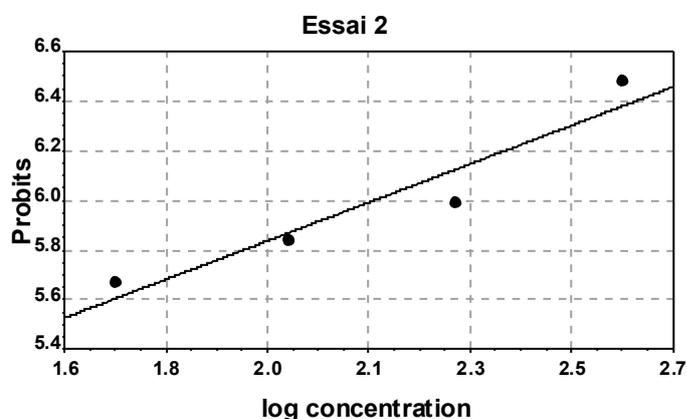
$$Y = 0,69 x + 4,5.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,99$$

3. Erreur standard

$$e = 0,002$$



1. Equation de la droite de régression

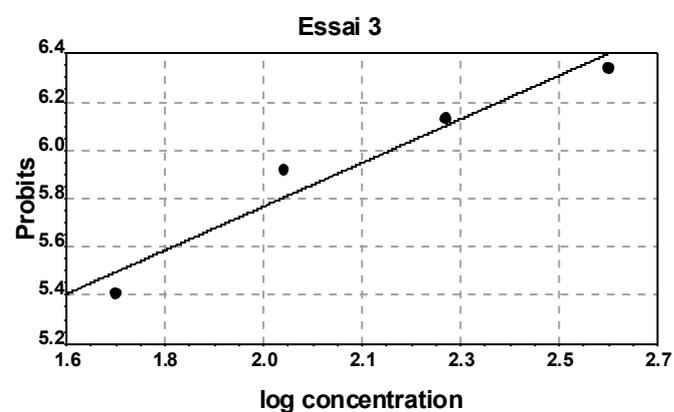
$$Y = 0,85 x + 4,16.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,95$$

3. Erreur standard

$$e = 0,12$$



1. Equation de la droite de régression

$$Y = 0,99 x + 3,81.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,97$$

3. Erreur standard

$$e = 0,11$$

Données graphiques relatives aux essais réalisés avec la molécule Zg6

**Tableau 43 : Valeurs du diamètre (cm) de la croissance radiale du mycélium de l'isolat KN1 traité par la molécule Zg7 à différentes concentrations**

Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
0	5,3	5,4	5,2
50	4,6	4	4
100	3,3	3,45	3,35
200	3,2	3,3	3,2
400	3	3	3,1

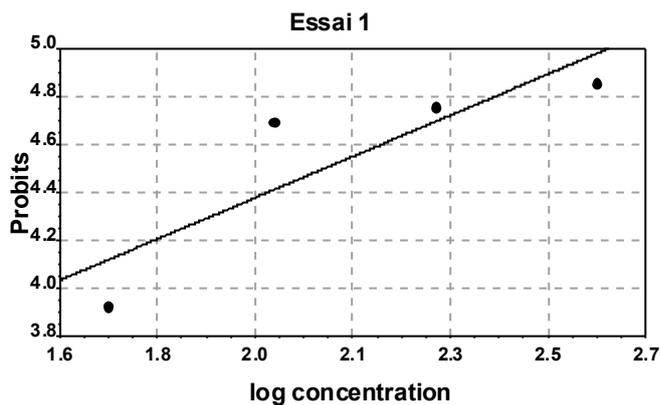
**Tableau 44 : Pourcentage d'inhibition (P %) de la biomasse mycélienne de l'isolat KN1 traité par la molécule Zg7 à différentes concentration**

Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
50	13,21	25,93	23,08
100	37,74	36,11	35,58
200	39,62	38,89	38,46
400	43,40	44,44	40,38

**Tableau 45 : Transformation des pourcentages d'inhibition en probits**

Log concentration	Essai 1		Essai 2		Essai 3	
	(P %)	probits	(P %)	probits	(P %)	probits
1,69	13,21	3,92	25,93	4,36	23,08	4,29
2	37,74	4,69	36,11	4,67	35,58	4,64
2,3	39,62	4,75	38,89	4,72	38,46	4,72
2,6	43,40	4,85	44,44	4,87	40,38	4,77

Clicours.COM



1. Equation de la droite de régression

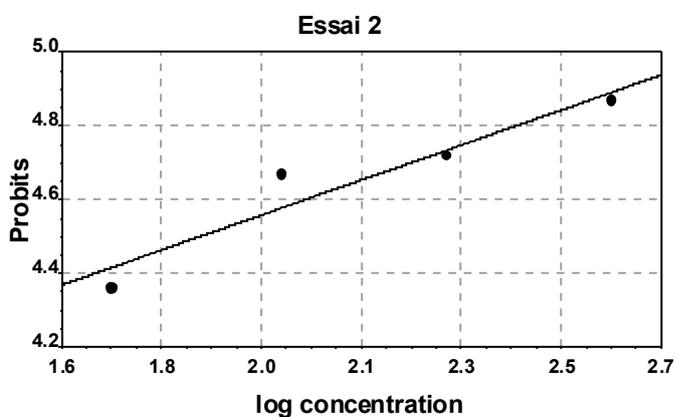
$$Y = 0,94 x + 2,53.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,86$$

3. Erreur standard

$$e = 0,26$$



1. Equation de la droite de régression

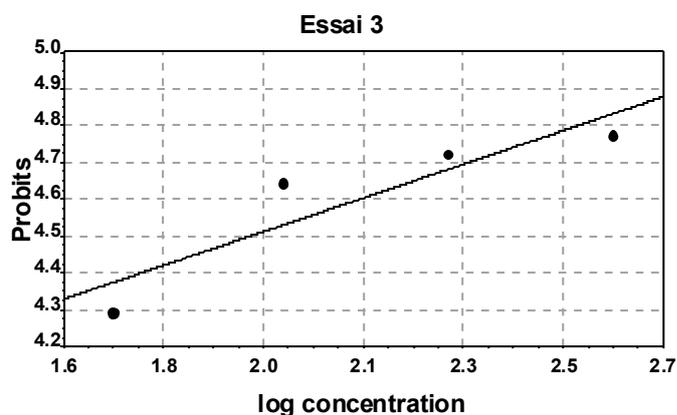
$$Y = 0,52 x + 3,53.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,95$$

3. Erreur standard

$$e = 0,078$$



1. Equation de la droite de régression

$$Y = 0,5 x + 3,52.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,9$$

3. Erreur standard

$$e = 0,11$$

Données graphiques relatives aux essais réalisés avec la molécule Zg7

**Tableau 46 : Valeurs du diamètre (cm) de la croissance radiale du mycélium de l'isolat KN1 traité par la molécule M1 à différentes concentrations**

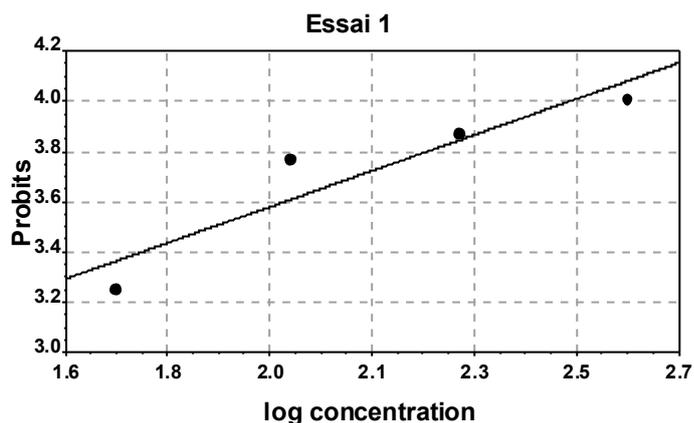
Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
0	8,2	8,2	8,5
50	7,9	7,8	7,7
100	7,3	7,6	7,5
200	7,1	7,2	7,3
400	6,9	7,1	7

**Tableau 47 : Pourcentage d'inhibition (P %) de la biomasse mycélienne de l'isolat KN1 traité par la molécule M1 à différentes concentration**

Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
50	3,66	4,88	9,41
100	10,98	7,32	11,76
200	13,41	12,20	14,12
400	15,85	13,41	17,65

**Tableau 48 : Transformation des pourcentages d'inhibition en probits**

Log concentration	Essai 1		Essai 2		Essai 3	
	(P %)	probits	(P %)	probits	(P %)	probits
1.69	3,66	3,25	4,88	3,36	9,41	3,66
2	10,98	3,77	7,32	3,52	11,76	3,82
2,3	13,41	3,87	12,20	4,23	14,12	3,92
2,6	15,85	4,01	13,41	4,26	17,65	4,08



- Equation de la droite de régression

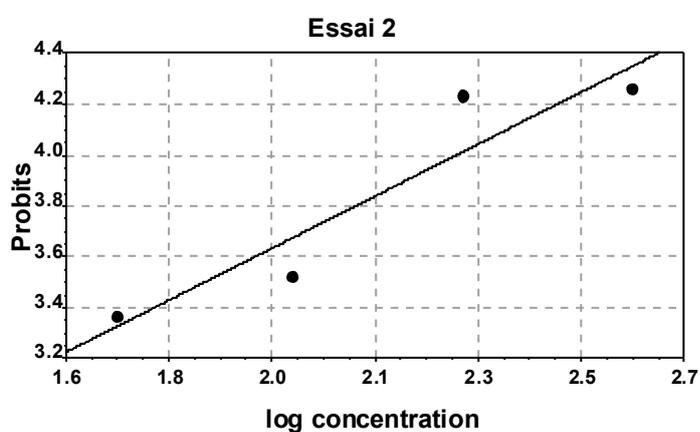
$$Y = 0,78 x + 2,03.$$

- Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,92$$

- Erreur standard

$$e = 0,14$$



- Equation de la droite de régression

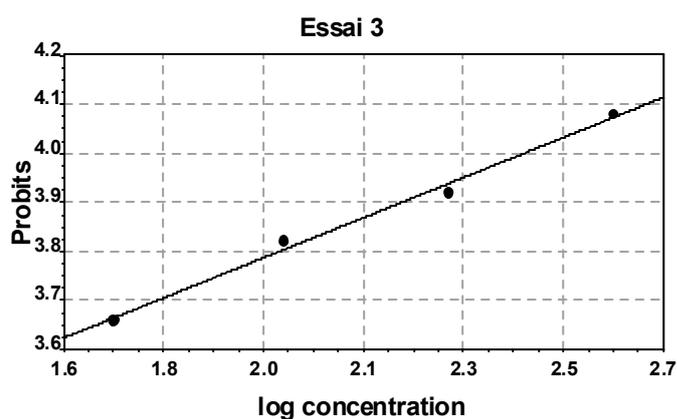
$$Y = 1,12 x + 1,42.$$

- Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,93$$

- Erreur standard

$$e = 0,2$$



- Equation de la droite de régression

$$Y = 0,44 x + 2,9.$$

- Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,99$$

- Erreur standard

$$e = 0,01$$

Données graphiques relatives aux essais réalisés avec la molécule M1

**Tableau 49 : Valeurs du diamètre (cm) de la croissance radiale du mycélium de l'isolat KN1 traité par la molécule M2 à différentes concentrations**

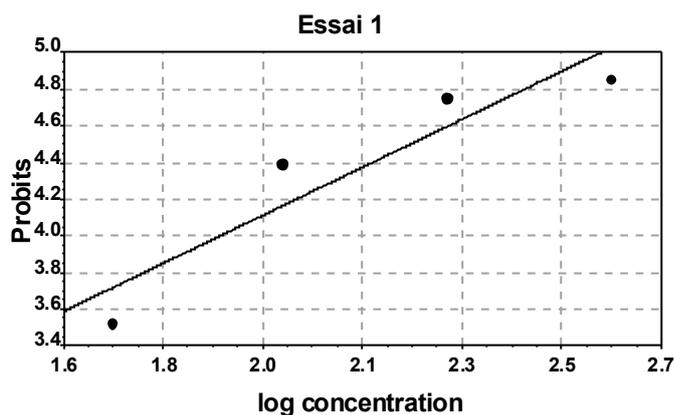
Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
0	8,1	8	8,2
50	7,5	6,3	6,9
100	5,9	5,3	6
200	4,9	5,1	5,7
400	4,5	4,8	4,7

**Tableau 50 : Pourcentage d'inhibition (P %) de la biomasse mycélienne de l'isolat KN1 traité par la molécule M2 à différentes concentration**

Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
50	7,41	21,25	15,85
100	27,16	33,75	26,83
200	39,51	36,25	30,49
400	44,44	40,00	42,68

**Tableau 51 : Transformation des pourcentages d'inhibition en probits**

Log concentration	Essai 1		Essai 2		Essai 3	
	(P %)	probits	(P %)	probits	(P %)	probits
1,69	7,41	3,52	21,25	4,19	15,85	4,01
2	27,16	4,39	33,75	4,59	26,83	4,39
2,3	39,51	4,75	36,25	4,64	30,49	4,50
2,6	44,44	4,85	40,00	4,75	42,68	4,82



1. Equation de la droite de régression

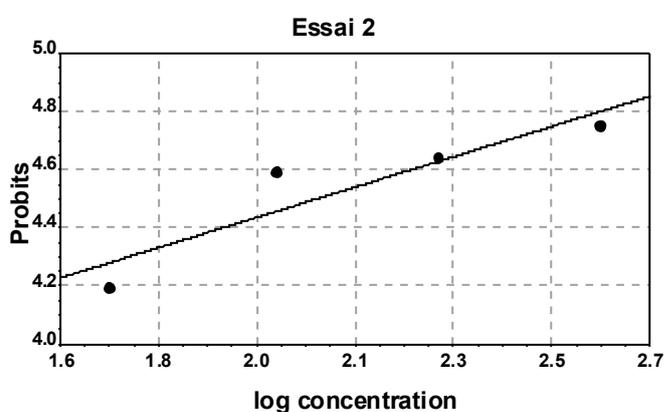
$$Y = 1,44 x + 1,25.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,93$$

3. Erreur standard

$$e = 0,26$$



1. Equation de la droite de régression

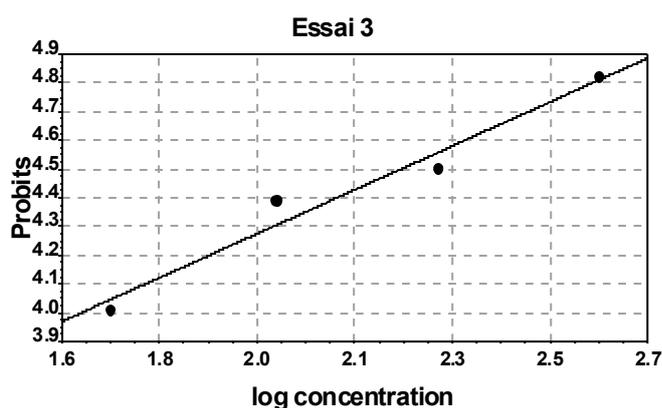
$$Y = 0,57 x + 3,31.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,91$$

3. Erreur standard

$$e = 0,11$$



1. Equation de la droite de régression

$$Y = 0,83 x + 2,62.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,98$$

3. Erreur standard

$$e = 0,076$$

Données graphiques relatives aux essais réalisés avec la molécule M2

**Tableau 52 : Valeurs du diamètre (cm) de la croissance radiale du mycélium de l'isolat KN1 traité par la molécule M3 à différentes concentrations**

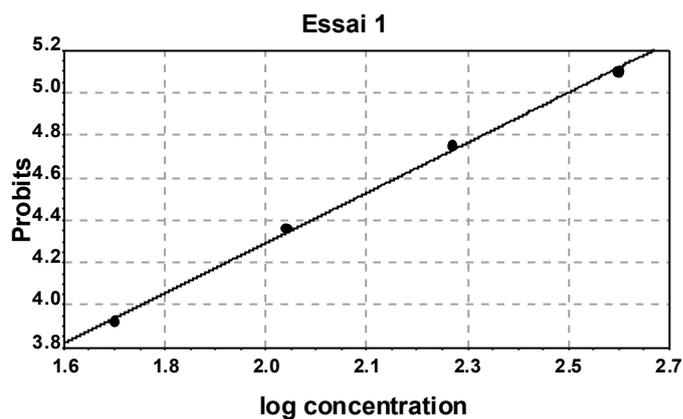
Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
0	8,1	8,3	8,2
50	7	7,5	7,1
100	6	6	5,9
200	4,9	5	5,1
400	3,7	3,8	3,7

**Tableau 53 : Pourcentage d'inhibition (P %) de la biomasse mycélienne de l'isolat KN1 traité par la molécule M3 à différentes concentration**

Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
50	13,58	9,64	13,41
100	25,93	27,71	28,05
200	39,51	39,76	37,80
400	54,32	54,22	54,88

**Tableau 54 : Transformation des pourcentages d'inhibition en probits**

Log concentration	Essai 1		Essai 2		Essai 3	
	(P %)	probits	(P %)	probits	(P %)	probits
1,69	13,58	3,92	9,64	3,72	13,41	3,87
2	25,93	4,36	27,71	4,42	28,05	4,42
2,3	39,51	4,75	39,76	4,75	37,80	4,69
2,6	54,32	5,10	54,22	5,10	54,88	5,10



1. Equation de la droite de régression

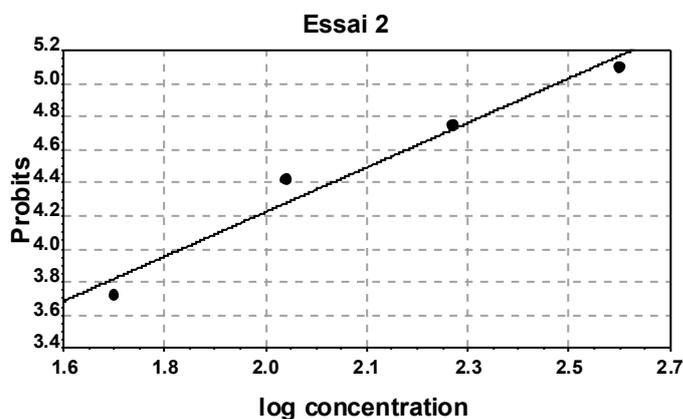
$$Y = 1,29 x + 1,74.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,99$$

3. Erreur standard

$$e = 0,02$$



1. Equation de la droite de régression

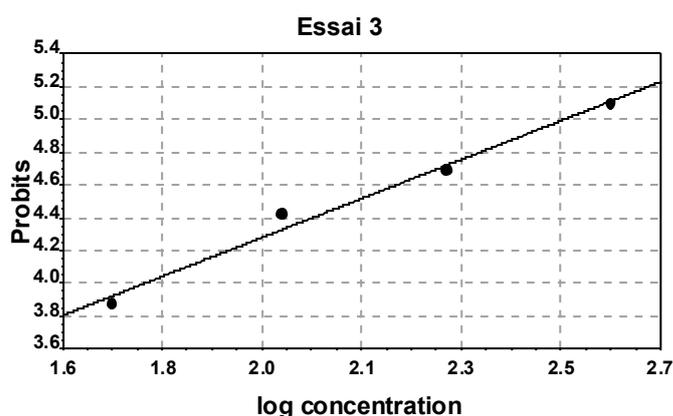
$$Y = 1,47 x + 1,32.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,98$$

3. Erreur standard

$$e = 0,13$$



1. Equation de la droite de régression

$$Y = 1,3 x + 1,71.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,99$$

3. Erreur standard

$$e = 0,078$$

Données graphiques relatives aux essais réalisés avec la molécule M3

**Tableau 55 : Valeurs du diamètre (cm) de la croissance radiale du mycélium de l'isolat KN1 traité par la molécule M4 à différentes concentrations**

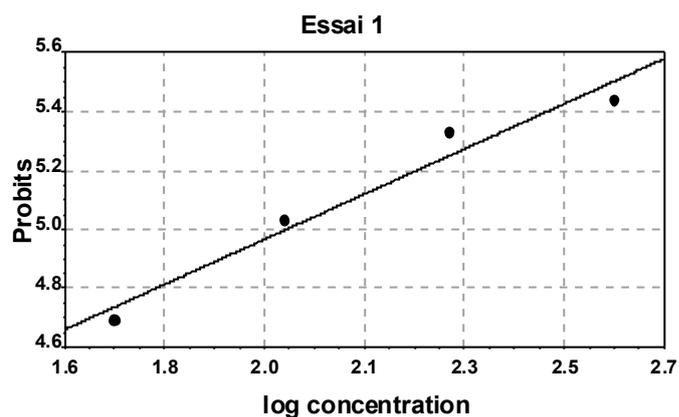
Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
0	8,1	8,2	8,3
50	5	4,9	4,5
100	4	3,9	3,8
200	3	3,5	3,2
400	2,7	3,2	2,9

**Tableau 56 : Pourcentage d'inhibition (P %) de la biomasse mycélienne de l'isolat KN1 traité par la molécule M4 à différentes concentration**

Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
50	38,27	40,24	45,78
100	50,62	52,44	54,22
200	62,96	57,32	61,45
400	66,67	60,98	65,06

**Tableau 57 : Transformation des pourcentages d'inhibition en probits**

Log concentration	Essai 1		Essai 2		Essai 3	
	(P %)	probits	(P %)	probits	(P %)	probits
1.69	38,27	4,69	40,24	4,77	45,78	4,90
2	50,62	5,03	52,44	5,08	54,22	5,13
2,3	62,96	5,33	57,32	5,20	61,45	5,31
2,6	66,67	5,44	60,98	5,28	65,06	5,41



1. Equation de la droite de régression

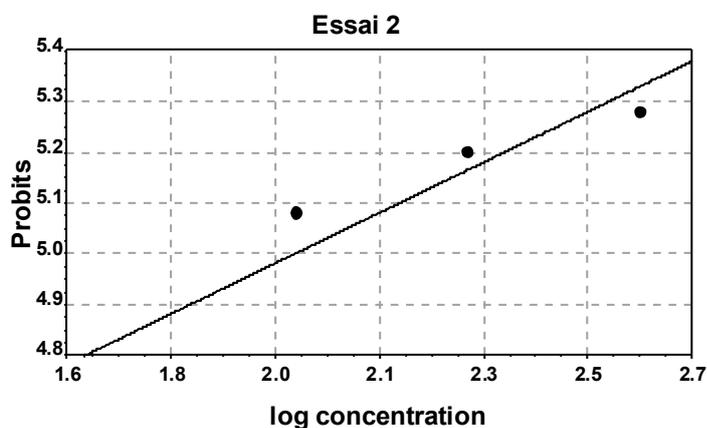
$$Y = 0,84 x + 3,31.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,97$$

3. Erreur standard

$$e = 0,08$$



1. Equation de la droite de régression

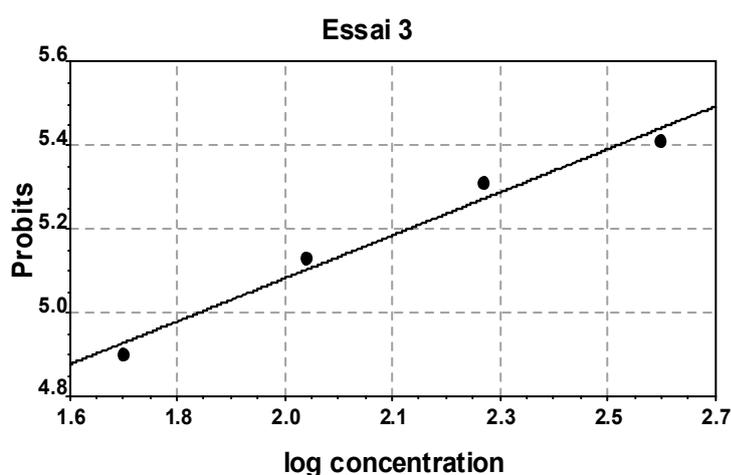
$$Y = 0,54 x + 3,9.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,95$$

3. Erreur standard

$$e = 0,08$$



1. Equation de la droite de régression

$$Y = 0,56 x + 3,97.$$

2. Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,98$$

3. Erreur standard

$$e = 0,044$$

Données graphiques relatives aux essais réalisés avec la molécule M4

**Tableau 58 : Valeurs du diamètre (cm) de la croissance radiale du mycélium de l'isolat KN1 traité par la molécule M5 à différentes concentrations**

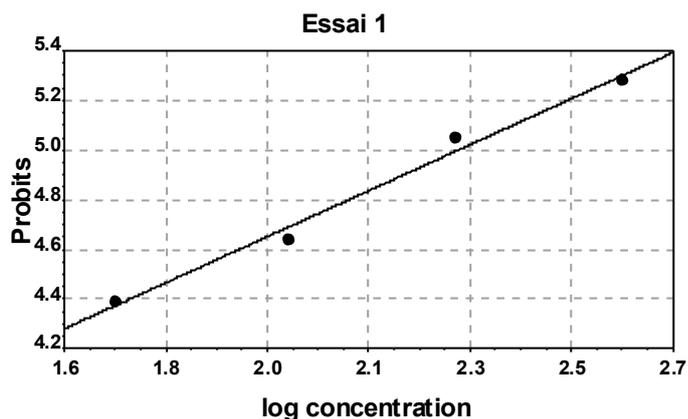
Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
0	8,2	8,6	8,2
50	6	5,8	5,9
100	5,3	5,2	5,1
200	3,9	3,8	4
400	3	2,9	3,2

**Tableau 59 : Pourcentage d'inhibition (P %) de la biomasse mycélienne de l'isolat KN1 traité par la molécule M5 à différentes concentration**

Concentration (ppm)	Essai 1	Essai 2	Essai 3
50	26,83	32,56	28,05
100	35,37	39,53	37,80
200	52,44	55,81	51,22
400	63,41	66,28	60,98

**Tableau 60 : Transformation des pourcentages d'inhibition en probits**

Log concentration	Essai 1		Essai 2		Essai 3	
	(P %)	probits	(P %)	probits	(P %)	probits
1.69	26,83	4,39	32,56	4,56	28,05	4,45
2	35,37	4,64	39,53	4,75	37,80	4,69
2,3	52,44	5,05	55,81	5,15	51,22	5,05
2,6	63,41	5,28	66,28	5,44	60,98	5,28



- Equation de la droite de régression

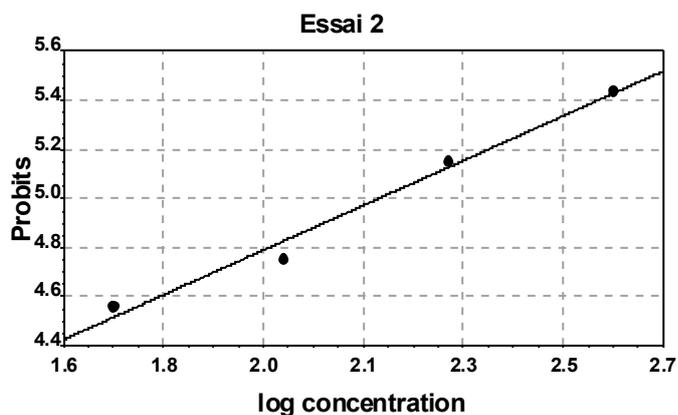
$$Y = x + 2,65.$$

- Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,99$$

- Erreur standard

$$e = 0,055$$



- Equation de la droite de régression

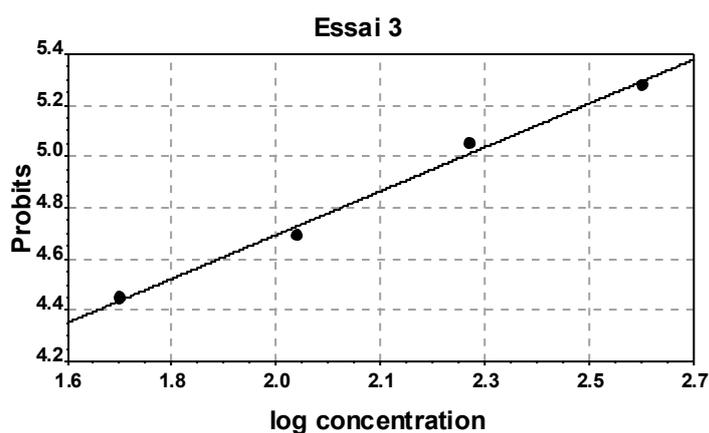
$$Y = x + 2,88.$$

- Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,99$$

- Erreur standard

$$e = 0,065$$



- Equation de la droite de régression

$$Y = 0,94 x + 2,84.$$

- Coefficient de détermination

$$R^2 = 0,99$$

- Erreur standard

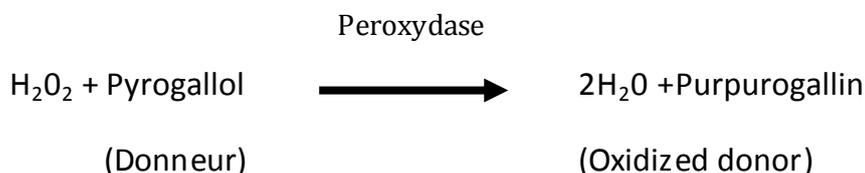
$$e = 0,41$$

Données graphiques relatives aux essais réalisés avec la molécule M5

## ***Annexe 04***

### Méthode du dosage de la peroxydase (EC 1.11.1.7)

#### Principe:



**Conditions:** T = 20°C, pH = 6.0, A<sub>420</sub>nm, Light path = 1 cm

**Méthode:** Continuous Spectrophotometric Rate Determination

**Réactifs:** Les solutions doivent être utilisées au moment d'emploi.

- 1.** Tampon phosphate 100 mM, pH=6 à 20°C: (on dissous 1,36 gr de phosphate de potassium monobasique dans 100 ml eau distillée, on ajuste à pH 6.0 à 20°C avec KOH 1M).
- 2.** Solution de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0.50% (on prépare 50 ml de la solution peroxyde d'hydrogène 3% dans de l'eau distillée).
- 3.** Solution de pyrogallol 5% (mettre à l'abri de la lumière)
- 4.** Filtrat de culture.

#### Méthode du dosage :

	Test	Blanc
Eau distillée	1,2 ml	1.2 ml
Tampon phosphate 100 mM pH 6	0,32 ml	0,32 ml
Solution de peroxyde d'hydrogène 0,5%	0,16 ml	0,16 ml
Solution de pyrogallol 5%	0,32 ml	0,32 ml

Filtrat de culture dénaturé 100°C pendant 5 mn	-	1 ml
Filtrat de culture	1 ml	-

Mélanger par inversion des tubes puis laisser se reposer à 20°C pendant 5 min, enregistrer les valeurs de la Do A420 nm à temps 0 seconde et après 20 secondes.

**Méthode de calcul :**

$$\left( \text{Unité/ml} \right)_{enzyme} = \frac{\frac{\Delta A_{420} \text{ test}}{20 \text{ s}} - \frac{\Delta A_{420} \text{ blanc}}{20 \text{ s}}}{12} \times 3 \times df$$

s = seconds

3 = Volume (in milliliters) of assay

df = Dilution factor

1 = Volume (millilitre) de filtrat de culture utilisé.

12 = coefficient d'extinction de 1 mg/ml de Purpurogallin à 420 nm

### Méthode de dosage de la Superoxyde Dismutase

#### Reagents :

- 0.067 M Potassium phosphate buffer, pH 7.8 (100 ml)
- 0.1 M Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) (50 ml)  
(1.86 gr / 50 ml H<sub>2</sub>O)
- 1.5 mM Nitroblue tetrazolium (NBT) (store cold) (20 ml)  
(0.024 gr/20 ml= 1.5 mM).
- 0.12 mM Riboflavin (store cold in a dark bottle) (20 ml)  
(0.045 gr/10 ml = 12 mM; 0.2 ml de cette solution dans 19.8 ml H<sub>2</sub>O)

#### Procedure: Pipette into a series of tubes:

	Test	blank
EDTA	0.2 ml	0.2 ml
NBT	0.1 ml	0.1 ml
Filtrate	1 ml	1 ml (100°C / 5mn)
Phosphate buffer	0.6 ml	0.6 ml

- ✓ Incubate the tubes for 10 minutes to achieve a standard temperature
- ✓ At zero time and at timed intervals add 0.50 ml riboflavin.
- ✓ Incubate for 10 minutes and at timed intervals (30 seconds and at 5 mn 30 seconds) read A<sub>550</sub>.

**Determine percent inhibition of NBT reduction:**

One unit of SOD inhibits the rate of increase in absorbance at 550 nm by 50% under the conditions of the assay. The percent inhibition of the test sample correlates with SOD activity using a SOD standard curve.

Determine the rate of increase in absorbance units (A) per minute for the negative control and for the test sample(s).

$$\Delta A_{550nm} / mn = \frac{A_{550 nm} \text{ at } 5mn \text{ } 30s - A_{550 nm} \text{ at } 30s}{5 mn}$$

Determine the % inhibition for the test sample(s).

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\Delta A_{550nm} / mn \text{ control}) - (\Delta A_{550nm} / mn \text{ test})}{(\Delta A_{550nm} / mn \text{ control})} \times 100$$

### Méthode de dosage des protéines par la méthode de Bradford

Cette méthode très en faveur pour la quantification des protéines est basée sur la capacité des protéines à fixer le bleu brillant de Coomassie G-250 et à former un complexe, dont le coefficient d'extinction est supérieur à celui du colorant libre.

Ce procédé est simple, rapide et peu coûteux. Les solutions de protéines alcalines et les détergeant interfèrent avec cette méthode. Le bleu brillant de Coomassie G-250 ou le colorant Serva G existent sous deux formes (bleu et orange) en solutions acides. Les protéines fixent préférentiellement la forme bleue.

#### Protocole :

- 1.** Préparer une série de tubes contenant 0,1 à 5 µg de sérum albumine dans un volume final de 50 µl
- 2.** Préparer quelques tubes contenant 50 µl de dilutions croissantes de l'échantillon (0,1 à 5 µg de protéines)
- 3.** Ajouter 950 µl de la solution de colorant à tous les tubes.
- 4.** Laisser les tubes à températures ambiante pendant environ 5 minutes.
- 5.** Lire l'absorbance à 595 nm contre un blanc 50 µl de tampon de protéine et 950 µl de la solution de colorant
- 6.** Utiliser la courbe étalon pour calculer la concentration en protéine des échantillons.

#### Réactifs :

Le bleu Serva G de Serva Feinbiochemica est le plus pur des colorants disponibles dans le commerce. Il est chimiquement identique au bleu brillant de Coomassie et peut donc remplacer avantageusement dans le test de Bradford. On prépare la solution de colorant en mélangeant:

Coomassie G-250	10 mg
Acide phosphorique à 88%	10 ml
Ethanol absolu	4.7 ml
H <sub>2</sub> O	q.s.p 100 ml

Vérifier que l'absorbance de la solution à 550 nm est 1,18. Si ce n'est le cas, ajuster comme il convient avec de la poudre ou de l'eau. Comme la solution de colorant est presque saturée, un précipité peut se former au cours d'un stockage prolongé. Si cela se produit, filtrer sur du papier Whatman n°1 et recalibrer la concentration du colorant.