

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE DE BLIDA

THESE

Présentée à l'Institut d'Agronomie  
pour obtenir le **DIPLOME DE MAGISTER**  
Spécialité Sciences Agronomiques  
Option Protection des végétaux



Etude de l'antrachnose du Pois chiche due à *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. :  
Recherche du polymorphisme au niveau des protéines et des isoenzymes  
extracellulaires

par

Faouzia BENFREHA ZEMOULI

Soutenue le .....1997 devant le jury composé de :

M. N. SABAOU  
M. Z. BOUZNAD  
M. M.M. BELLAL  
M. M. LABDI  
M<sup>elle</sup> M. LOUANCHI

Président  
Promoteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE DE BLIDA

THESE



Présentée à l'Institut d'Agronomie  
pour obtenir le **DIPLOME DE MAGISTER**  
**Spécialité Sciences Agronomiques**  
**Option Protection des végétaux**

**Etude de l'antrachnose du Pois chiche due à *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. :**

**Recherche du polymorphisme au niveau des protéines et des isoenzymes  
extracellulaires**

par

**Faouzia BENFREHA ZEMOULI**

Soutenue le .....1997 devant le jury composé de :

- |                               |           |
|-------------------------------|-----------|
| M. N. SABAOU                  | Président |
| M. Z. BOUZNAD                 | Promoteur |
| M. M.M. BELLAL                | Examineur |
| M. M. LABDI                   | Examineur |
| M <sup>elle</sup> M. LOUANCHI | Examineur |

## AVANT - PROPOS

**A**vant d'exposer les résultats de ce travail, j'exprime toute ma reconnaissance à Mr Z. Bouznad pour m'avoir proposé ce sujet et pour l'avoir suivi et corrigé.

Je tiens également à remercier Mr N. Sabaou de l'école normale supérieure d'avoir bien voulu présider ce jury.

Mes vifs remerciements s'adressent aux autres membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail; je pense à Mr M.M. Bellal, Melle Louanchi de l'I.N.A. d'El Harrach et Mr Labdi de l'I.T.G.C. de Sidi Belabbès.

Je tiens à manifester ma gratitude à Mr D. Spire de la station de pathologie de l'I.N.R.A de Versailles pour m'avoir bien reçu, lui et son équipe, dans son laboratoire et m'avoir permis de réaliser l'étude sur l'électrophorèse.

Je remercie vivement le Dr Y. Bertheau du laboratoire de pathologie végétale de l'I.N.A de Paris pour m'avoir permis un stage sur l'isoélectrofocalisation dans son laboratoire et de m'avoir bien reçu, lui et son équipe.

J'exprime ma profonde gratitude à Melle Djamila Taleb de l'Université de Mascara, pour avoir assuré l'étude statistique et la saisie du document, ainsi que pour son aide précieuse et ses encouragements.

Je voudrais remercier aussi les collègues et amies pour la bonne ambiance et pour m'avoir encouragé durant tout le temps qu'a duré ce travail; je pense à C. Henni, K. Zelmat, D. Boukraâ, L. Mouley et K. Tchico de l'Université de Mascara.

Au moment où je termine cette thèse, je rend hommage à une personne qui m'a toujours encouragée à achever ce travail et qui n'est plus parmi nous; je pense à notre ami et collègue K. Benrebiha de l'Université de Blida.

Je terminerai par ma très chère famille en adressant mon affectueuse reconnaissance à ma très chère mère, qui m'a beaucoup soutenue à poursuivre mes études et dont les encouragements m'ont été très précieux, et également à mon cher mari qui m'a tout le temps soutenu et encouragé à mieux faire.

Je ne remerciais jamais assez mon frère Mohamed et mes soeurs Khadidja et Nadia que j'ai très souvent sollicité.

Enfin, ce travail n'a pu se faire sans la patience et l'amour de mes enfants: Mirvett, Mohamed, Dallel et Sid Ahmed.

*La main du Créateur à l'esprit se révèle  
D'une invisible plume il déchiffre le trait  
De ce que la nature, en son temple recèle  
Comme une colonnade enfin, l'ordre paraît.*

**Linné. C (1707-1778)**

## Abréviations

I.C.A.R.D.A : International Center For Agricultural Research in the Dry Areas .

I.C.R.I.S.A.T : International Crops Research Institute For the Semi Arids  
tropics in Inde .

PAGE : Electrophorèse en gel de Polyacrylamide .

P.E.G : Polyethylene Glycol .

S.D.S-PAGE : Electrophorèse en gel de Polyacrylamide avec SDS ( sodium dodecyl  
sulfate ) .

TEMED : Tetraméthylaminomethane .

TRIS : Tris - Hydroxyméthylaminomethane .

# SOMMAIRE

AVANT - PROPOS	
INTRODUCTION.....	01

## CHAPITRE I : Etude bibliographique et présentation du sujet

<b>1-La plante</b> .....	02
- 1.1- Caractères botaniques et systématiques .....	02
- 1.2- Caractères écologiques .....	03
- 1.3- Importance et valeur alimentaire du Pois chiche .....	03
<b>2- L'antracnose du Pois chiche</b> .....	04
- 2.1- Taxonomie et caractéristiques d' <i>Ascochyta rabiei</i> .....	04
- 2.2- La maladie .....	06
2.2.1- Impact économique .....	06
2.2.2- Symptômes .....	06
2.2.3- Epidémiologie .....	06
2.2.4- Variabilité d' <i>Ascochyta rabiei</i> .....	09
2.2.5- Méthodes de lutte .....	09
<b>3- Résistance du Pois chiche à <i>Ascochyta rabiei</i></b> .....	10
- 3.1- Sur le plan génétique .....	10
- 3.2- Sur le plan pathologique. ....	10
<b>4- Détection d'activités enzymatiques et de toxines chez <i>Ascochyta rabiei</i></b> ....	11
- 4.1- Production d'enzymes hydrolytiques par <i>Ascochyta rabiei</i> .....	11
- 4.1.1- Caractéristiques des constituants de la paroi cellulaire et dégradation enzymatique.....	11
- 4.1.1.1- Les principaux polysaccharides constitutifs .....	11
- 4.1.1.2- Les principales enzymes hydrolytiques .....	12
- 4.1.2- Détection des activités enzymatiques chez <i>Ascochyta rabiei</i> .....	16
- 4.2- Production de phytotoxines par <i>Ascochyta rabiei</i> .....	17

<b>5- Variabilité protéique et enzymatique chez <i>Ascochyta rabiei</i></b> .....	17
5.1- Protéines et caractérisation des organismes .....	17
5.2- Etude électrophorétique des protéines et des isoenzymes chez <i>Ascochyta rabiei</i> .....	17

<b>6- Conclusion et présentation du sujet</b> .....	18
---	----

**CHAPITRE II : Matériels et méthodes**

<b>1- Matériel biologique</b> .....	19
1.1- L'hôte .....	19
1.2- Le matériel fongique .....	19
1.2.1- Origine des isolats .....	19

<b>2- Etude du pouvoir pathogène des isolats</b> .....	20
2.1- Les milieux de culture .....	20
2.2- Conditions d'obtention des plantules .....	20
2.3- Inoculation des plantes .....	20
2.4- Notations et traitement des données .....	21

<b>3- Etude des activités enzymatiques</b> .....	21
3.1- Obtention des filtrats de cultures .....	21
3.1.1- A partir des filtrats de culture .....	21
3.1.2- A partir des tissus frais parasités ou non .....	22
3.2- Dosage des enzymes .....	25
3.2.1- Les enzymes extracellulaires : le test APIZYM .....	25
3.2.2- Les enzymes dépolymérisantes .....	25
3.3- Dosage des protéines .....	30

<b>4- Etude électrophorétique des protéines et enzymes</b> .....	30
4.1- Eléctrophorèse des protéines totales .....	30
4.1.1- Principe .....	30
4.1.2- Méthode analytique .....	30
4.1.3- Préparation des échantillons .....	31

4.1.4- Composition des gels de polyacrylamide en plaque (condition native - PAGE).....	31
4.1.5- Conditions de migration .....	31
4.1.6- Système de révélation des protéines .....	31
4.2- Révélation des estérases.....	32
4.3- Isoélectrofocalisation et révélation d'activités dépolymérisantes .....	32
4.3.1- Principe .....	32
4.3.2- Préparation des échantillons .....	32
4.3.3- Composition du gel de polyacrylamide .....	32
4.3.4- Mise en place des échantillons et migration .....	33
4.3.5- Mise en évidence des activités enzymatiques .....	33

### CHAPITRE-III : Résultats et discussions

1- Evaluation du pouvoir pathogène des isolats d' <i>Ascochyta rabiei</i> .....	34
2- Evaluation <i>in vitro</i> des activités enzymatiques .....	36
2.1- Révélation des enzymes extracellulaires par le système APIZYM .....	36
2.2- Variabilité biochimique d' <i>Ascochyta rabiei</i> .....	37
2.2.1- Influence du milieu : comparaison de l'effet de trois milieux liquides: Mathur-pectine, Mathur et Diffusât de Pois chiche .....	37
2.2.1.1- Evolution du pH .....	38
2.2.1.2- Evolution du poids pondéral .....	40
2.2.1.3- Evolution des concentrations des protéines totales extracellulaires .....	42
2.2.1.4- Activité des polygalacturonases (PG) .....	44
2.2.1.5- Activité des pectines Lyases (PL) .....	49
2.2.1.6- Activités des pectinéméthylestérases (PME) .....	54
2.2.1.7- Activité des endoglucanases (Cellulases Cx) .....	58
2.2.2- Variation des activités enzymatiques sur milieu Mathur - Pectine de 8 isolats d' <i>Ascochyta rabiei</i> .....	64
2.2.2.1- Variation du pH .....	64
2.2.2.2- Variation du poids pondéral .....	66
2.2.2.3- Variation des concentrations des protéines totales dans le milieu .....	67

2.2.2.4- Variation des activités polygalacturonases (PG) au pH optimum 5 .....	69
2.2.2.5- Variation des activités pectine Lyase (PL) au pH d'activité optimum 10.5 .....	71
2.2.2.6- Variation des activités des endoglucanases (Cx) au pH d'activité optimum 5 .....	73
2.2.2.7- Variation des activités pectinéméthylestérases (PME) .....	75
2.2.2.8- Recherche des activités hydrolases et transéliminases: méthode à l'acide thiobarbiturique (TBA) .....	78
2.2.3.- Discussion .....	79
<b>3- Evaluation <i>in vivo</i> des activités pectolytiques et cellulolytiques sur deux cultivars de Pois chiche (résistant et sensible) suite à une inoculation par deux isolats d'<i>Ascochyta rabiei</i> .....</b>	<b>82</b>
3.1- Production des polygalacturonases (PG) <i>in vivo</i> .....	82
3.2- Production des pectines Lyases (PL) <i>in vivo</i> .....	84
3.3- Production des endoglucanases (Cellulases, Cx) .....	86
3.4- Production des pectinéméthylestérases (PME) .....	88
3.5- Discussion .....	90
<b>4- Etudes du polymorphisme électrophorétiques des protéines et isozymes chez <i>Ascochyta rabiei</i>.....</b>	<b>92</b>
4.1- Protéines totales natives extracellulaires .....	92
4.2- Profils enzymatiques des estérases extracellulaires .....	95
4.3- Détection des isoenzymes dépolymérisantes par isoélectrofocalisation (IEF) .....	98
4.4- Discussion .....	104
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>106</b>

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## ANNEXES

*INTRODUCTION*

## INTRODUCTION

L'antracnose du Pois chiche (*Cicer arietinum L.*), causée par *Ascochyta rabiei* (Passerini) Labrousse, est responsable de la régression de cette culture dans la plupart des zones où elle est cultivée. (Nene et Reddy, 1987).

En Algérie, cette culture qui fournit une graine riche en glucides et en protéines, est caractérisée par une production instable due principalement à la présence de cette maladie et à l'utilisation d'un matériel végétal hétérogène et peu amélioré. Les programmes internationaux actuels, sur les légumes secs, encouragent les efforts nationaux à améliorer la production de cette culture, notamment par l'utilisation de variétés résistantes.

Pour stabiliser la productivité de cette culture, une attention particulière est donnée à la sélection, pour la résistance aux différents stress biotiques et abiotiques. L'évaluation de cette résistance pour l'antracnose nécessite une meilleure connaissance du champignon. En effet, *Ascochyta rabiei* est un champignon qui présente une grande variabilité morphologique et pathologique. Ainsi, le programme de sélection a mis en évidence une grande variabilité dans le comportement des variétés sélectionnées pour leur résistance vis-à-vis des isolats algériens (Djaoui, 1985; Djellali, 1988; Yanina, 1990; Labdi, 1990; El Biari, 1995).

Les différentes études biologiques et pathologiques ont révélé une variabilité remarquable entre les isolats ayant des origines géographiques différentes et pouvant ainsi mettre en échec l'introduction de variétés notées tolérantes.

Une étude portant sur la corrélation entre les activités enzymatiques *in vitro* et le pouvoir pathogène, a montré que les isolats les plus agressifs sont ceux qui produisent le plus d'enzymes hydrolytiques (Tchicha, 1991). Par ailleurs, une étude sur les toxines a également montré une corrélation positive entre l'agressivité et la sécrétion de toxines (Latif et al., 1993). Ces études mettent en évidence une variabilité biochimique du champignon.

Tous ces travaux ont contribué à mieux connaître le pathogène et sa pathologie et donc à expliquer la différence dans les comportements des lignées sélectionnées. Ils permettront la mise en place d'une stratégie de lutte spécifique afin d'améliorer la sélection à la résistance.

Le but de notre travail serait donc d'apporter une contribution à la connaissance de la diversité biochimique de ce champignon par l'étude des activités enzymatiques pectolytiques et cellulolytiques *in vitro* et *in vivo*.

## ***CHAPITRE I***

***Etude bibliographique et présentation du sujet***

# 1- La plante

## 1.1- Caractères botaniques et systématiques

Le Pois chiche (*Cicer arietinum L.*) est une légumineuse de la sous famille des Papilionacées, tribu des Viciées (Deysson, 1979).

Le genre *Cicer* occupe une place intermédiaire entre *Vicia* et *Ononis* de la tribu des Trifoliées selon Popov (Ameziane, 1981). Selon ce même auteur, le genre *Cicer* primitif est le résultat de l'hybridation entre *Vicia* primitif et *Ononis*.

Ce genre renferme 22 espèces à exigences écologiques très semblables malgré une très large aire de distribution géographique. On le rencontre surtout dans les zones semi arides du globe. En Europe: la Grèce; l'Espagne, la Crête; en Asie: la Turquie, l'Iran, la Syrie, la Palestine, le Caucasse, l'Iraq, l'Afghanistan, l'Himalaya occidental. En Afrique, on connaît deux espèces endémiques *Cicer curriatum* en Ethiopie et *Cicer atlanticum* dans le Haut Atlas au Maroc (Ameziane, 1981).

Le Pois chiche est une plante annuelle caractérisée par une tige principale variant de 30 à 50 cm et 2 ramifications primaires; les feuilles sont composées, imparipennées (11 à 13 folioles dentelées).

C'est une plante autogame (on note seulement 1 à 2% d'allogamie); les fleurs sont blanches roses, violettes ou bleues, et sont de type papilionacé (Saxena, 1984).

Le Pois chiche est une plante à croissance indéterminée: on trouve ainsi sur la même plante des boutons floraux, des fleurs épanouies et des gousses plus ou moins développées. Chaque gousse contient en général 1 à 2 graines, parfois 3; les gousses sont ovales et réniformes. Elles n'éclatent pas à maturité. Les graines sont plus ou moins rondes, pourvues d'un bec, leur taille et leur aspect (lisse ou ridé) variant selon les variétés, tout comme leur couleur: blanche, jaune, noire (Anonyme, 1988).

Il existe de nombreuses variétés de Pois chiche qui peuvent être classées en 3 grands types:

Le type KABULI: cultivé et consommé surtout dans le bassin méditerranéen. La graine de taille moyenne à grosse est de couleur claire.

Le type DESI: dont la graine plus petite, est de couleur sombre (marron clair à noire). Il représente 80% de la production mondiale en Asie.

Le type GULABI: ce type peu cultivé, présente des graines lisses et claires, avec un bec caractéristique.

Toutes les parties vertes de la plante, folioles et gousses notamment, possèdent des poils glandulaires sécrétant des exsudats acides: acide malique et des traces d'acide oxalique et acétique (Sattar, 1933 cité par Nasraoui et al, 1987).

Le Pois chiche, comme la plupart des espèces des légumineuses, porte sur ses racines des nodosités résultant de l'hypertrophie des tissus et de leur dégénérescence gommeuse sous l'influence d'une bactérie: *Rhizobium ciceri* (Saxena, 1984); cette bactérie est capable d'assimiler l'azote atmosphérique ce qui permet à cette légumineuse de se passer d'engrais azotés en fixant l'azote atmosphérique. Quand elles sont ensuite enfouies dans le sol, elles lui restituent l'azote ainsi fixé, ce qui équivaut à une fumure. Elles sont dites pour cela plantes améliorantes (Deyson, 1979).

## 1.2- Caractères écologiques

Les espèces primitives poussent dans les montagnes de moyenne et haute altitude. Elles ne supportent pas l'humidité, mais s'accommodent par contre de fortes chaleurs. C'est la légumineuse à grains la plus résistante à la sécheresse. Sa résistance au froid est faible pour des températures inférieures à -10°C. Le Pois chiche nécessite pour l'accomplissement de son cycle végétatif 4 à 5 mois et exige de fortes intensités lumineuses. C'est une plante de jours longs, et les jours courts empêcheraient la floraison (Ameziane, 1981).

## 1.3- Importance et valeur alimentaire du Pois chiche

Le Pois chiche est populaire à cause de son utilisation culinaire. Il a une bonne valeur alimentaire pour la richesse des graines en matières azotées et en matières grasses (Tableau 1 et 2).

Le Pois chiche est aussi décrit comme plante médicinale. La sécrétion oxalique, malique et acétique des parties glandulaires des feuilles et des gousses est collectée pour être utilisée comme médicament contre les coliques et contre les morsures d'insectes. Le Pois chiche est aussi conseillé pour réduire l'accumulation du cholestérol dans le sang (Merchant, 1984).

**Tableau 1:** Composition chimique des graines de Pois chiche  
(in Villax, 1963, cité par Bret, 1990)

Nature du produit	Composition chimique en pourcentage					
	Eau	Matières azotées	Matières grasses	Hydrates de C solubles	Fibres	Cendres
	12	20	5	58	2	3

**Tableau 2:** Compositions moyennes comparées du Pois chiche, du Pois et du Blé (Anonyme, 1988)

Composition moyenne en (g/kg MS)

	Pois chiche	Pois	Blé
Matières azotées totales	244	250	129
Lysine	15.7	18.5	3.7
Méthionine	2.8	2.5	2.1
Cystine	3.6	3.7	3.2
Thrionine	8.3	9.6	4.0
Tryptophane	-	2.0	1.6
Amidon	464	500	685
Cellulose Weende	40	61	28
Minéraux	34	40	19
Phosphore	3.9	5.0	3.8
Calcium	1.7	0.9	0.7
Matières grasses	47	18	24

## 2- L'antracnose du Pois chiche

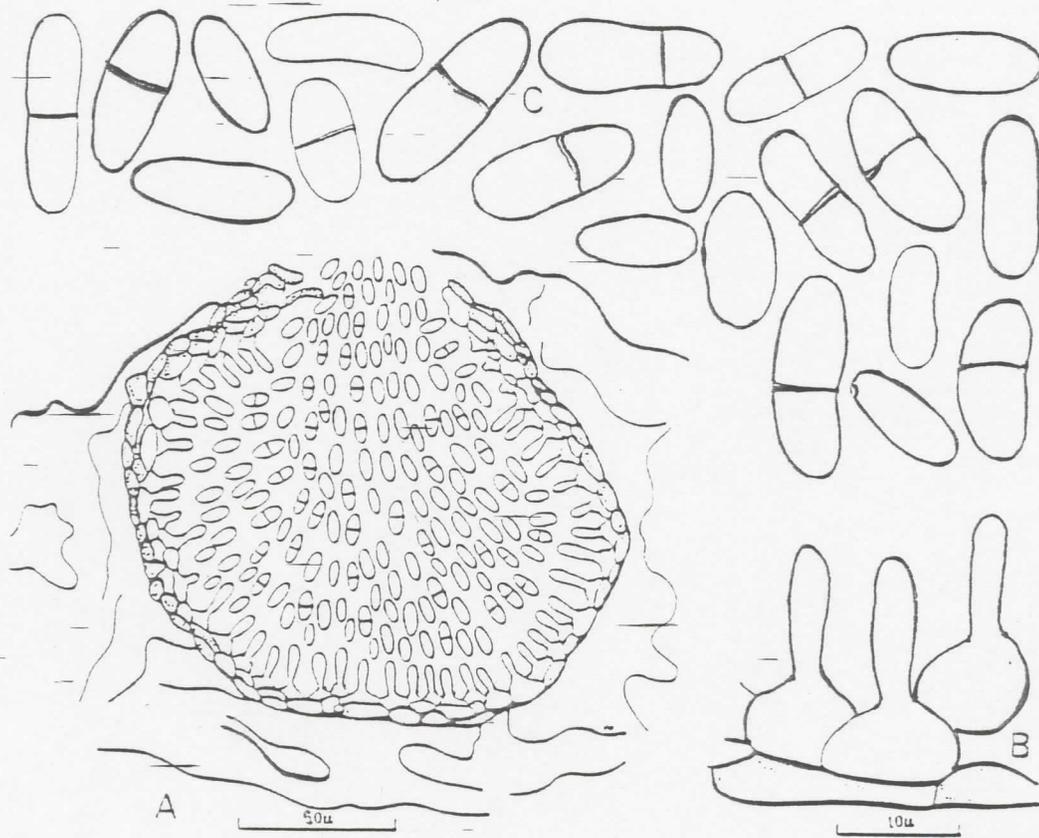
### 2.1- Taxonomie et caractéristiques d'*Ascochyta rabiei*

*Ascochyta rabiei* appartient à la subdivision des Deuteromycota (champignons imparfaits), à la classe des Coelomycètes (présence d'appareils sporifères du type pycnide) et à l'ordre des Sphaeropsidales (Agris, 1988).

La forme imparfaite du champignon est caractérisée par la formation de pycnides visibles sur les lésions portées par l'hôte; sphériques ou piriformes pourvues d'un ostiole et mesurant 245 $\mu$  de diamètre (Sattar, 1934 cité par Nene et Reddy, 1987). Les hyphes sont hyalins ou bruns et septés. Les pycnides contiennent des spores portées par de courts conidiophores baignant dans une masse mucilagineuse (cirrhe). Les pycniospores sont généralement unicellulaires, occasionnellement bicellulaires, ovales ou cylindriques, droites ou légèrement arrondies à une ou deux extrémités et hyalines. Kovachevski en 1936 (Nene et Reddy, 1987) rapporte une taille des spores de 6.0 à 16.0 $\mu$  x 3.4 à 5.6 $\mu$  sur l'hôte et de 4.8 à 14.0 $\mu$  x 3.2 à 5.2 $\mu$  sur milieu artificiel. Cette taille serait de 8.2 à 10 $\mu$  sur 4 à 5 $\mu$  selon Khunet et Kapoor (1980) ou 8.2 à 10 $\mu$  sur 4.2 à 4.5 $\mu$  selon Nene et Reddy (1987) (Fig 1).

La forme parfaite d'*A. rabiei*, *Didymella rabiei* (Kovachevsky) v. Arx, appartient à la subdivision des Ascomycotina, à la classe des Loculoascomycetes et à l'ordre des Dothideales (Arx, 1987).

La forme parfaite a été observée en 1936 par Kovachevski et la nomma *Mycosphaerella rabiei* Kovachevski. Les perithèces ont été observés uniquement sur des gosses abandonnées sur le champ durant l'hiver. Ils sont brun-noir globuleux ou aplatis avec un bec très net et un ostiole, avec une taille variant de 76 à 152 x 120 $\mu$ . Les asques sont cylindriques, plus ou moins courts, pédicellés mesurant de 48 à 70 x 9 à 13.7 $\mu$ . Les ascospores (8 par asque) sont ovoïdes, divisés en 2 ou unicellulaires avec une constriction au niveau de la cloison, mesurant de 12.5 à 19 x 6.7 $\mu$ . La forme parfaite a également été observée en URSS par Gorlenko et Bushkova en 1958 et en Grèce par Zachos et al en 1963 (Nene et Reddy, 1987).



A. Vertical section of pycnidium; B. part of pycnidial wall and conidiophores; C. conidia.

Fig 1: *Ascochyta rabiei* (in CMI n° 337)

- A- Section verticale de la pycnide
- B- Paroi pycnidiale et conidiophores
- C- Conidie

## 2.2- La maladie

### 2.2.1- Impact économique

Cette maladie a été décrite en 1911 au Pakistan par Buttler (Nene et Reddy, 1987). L'anthracnose a dû exister avant puisque le Pois chiche est une ancienne culture dans le subcontinent indien. Depuis, elle a été décrite dans la plupart des pays où la culture y est pratiquée (Nene et Reddy, 1987) (Fig 2).

Cette maladie se répand et sa capacité destructive fait qu'elle est devenue un facteur limitant de la production du Pois chiche. Des épidémies ont été reportées dans plusieurs pays produisant cette culture. Les pertes peuvent atteindre 20 à 100% de la production (Reddy, 1984).

### 2.2.2- Symptômes

La maladie affecte toutes les parties de la plante et ce durant tout le cycle végétatif de l'hôte (Reddy, 1984). Les plantules provenant de semences contaminées montrent des lésions brun foncé au niveau du collet. Sur les feuilles nouvellement formées, des petites taches blanches et nécrotiques apparaissent en conditions favorables. Ces lésions s'étendent rapidement et s'unissent causant le brunissement des bourgeons.

Sur feuilles âgées, les lésions sont arrondies ou allongées avec un centre gris et des marges brunâtres. Les pycnides apparaissent comme des points noirs arrangés en cercles concentriques. Les graines produites dans ces gousses infectées présentent des lésions brun foncé. Quand les gousses sont atteintes dans leur jeune stade de développement, elles deviennent brunes et ne produisent pas de semence, ou produisent alors des graines sombres et ratatinées (Reddy, 1984).

Sur tiges et pétioles, les lésions sont brunes et allongées (3 à 4cm), les pycnides en forme de points noirs entourent souvent la portion affectée. Quand les lésions entourent la tige, la portion du dessus meurt rapidement (Reddy, 1984).

### 2.2.3- Epidémiologie

Les facteurs climatiques conditionnent l'importance de l'attaque du parasite. Aucune attaque ne peut avoir lieu en dessous de 6°C et ce quelque soit l'hygrométrie et pendant des périodes d'humidité inférieures à 6 heures et ce quelque soit la température. La température maximale permettant l'infection est de l'ordre de 30°C; des températures entre 15 et 25°C favorisent énormément le développement du pathogène (Bret, 1990). En conditions naturelles, des périodes humides prolongées, avec des températures d'environ 20°C sont très favorables à la propagation de la maladie. Les précipitations sont le facteur le plus important, et elles déterminent la gravité de l'épidémie; la pluie contribue en effet à la réalisation de l'infection puis à la dissémination du parasite et le vent aggrave la dissémination des spores (Bret, 1990).

La période de latence est définie comme étant le délai qui s'écoule entre l'infection et l'apparition des premiers symptômes. Elle augmente avec les basses températures: 5°C-18 jours; 10°C-9jours; 15°C-7jours; 20 à 25°C-5jours (Ameziane, 1985).

Ainsi, pour les températures de printemps qui correspondent à la période de culture du Pois chiche semé au printemps, la période de latence est courte, entraînant des invasions successives et rapides. Par contre, pour les semis d'hiver, la période de latence est beaucoup plus longue, ce qui ralentit l'extension de la maladie (Ameziane, 1985).

Les rapports sur les épidémies de la maladies indiquent l'existence de mécanismes efficaces pour la survie du champignon d'une saison à l'autre. Les débris malades et les graines infectées sont une source d'inoculum importante pour l'infection primaire pour la saison suivante.

Luthra et al en 1935, cité par Nene et Reddy (1987), trouvent que le champignon survit dans les tissus infectés conservés naturellement plus de 2 ans de 10 à 35°C et entre 0 et 3% d'humidité relative, à la surface du sol. Cependant, ce pathogène perd sa viabilité en 8 semaines à des profondeurs de 10 à 40cm entre 65 à 100% d'humidité.

Ce champignon est aussi capable de se multiplier en formant des pycnides fraîches sur les débris malades durant la saison pluvieuse (Nene et Reddy, 1987).

En 1932, Luthra et Bedi, (cité par Nene et Reddy, 1987), ont été probablement les premiers à démontrer la nature de transmission du pathogène par semence. Ils montrèrent que l'enveloppe de la graine et les cotylédons des semences infectées contiennent du mycelium.

La propagation de la maladie a été attribuée principalement aux pycnosporos produites par le foyer primaire de l'infection qui opère soit à travers les débris de récolte, ou les semences infectées. L'inoculum porté par les graines joue un rôle primordial dans l'épidémiologie de la maladie, nettement plus important que celui représenté par les débris, car plus de 93% des semences infectées sont capables de produire un foyer d'infection. En condition défavorable pour la maladie, on peut observé un redémarrage rapide des plants affectés pouvant produire raisonnablement selon la durée de la période de croissance (Nene et Reddy, 1987).

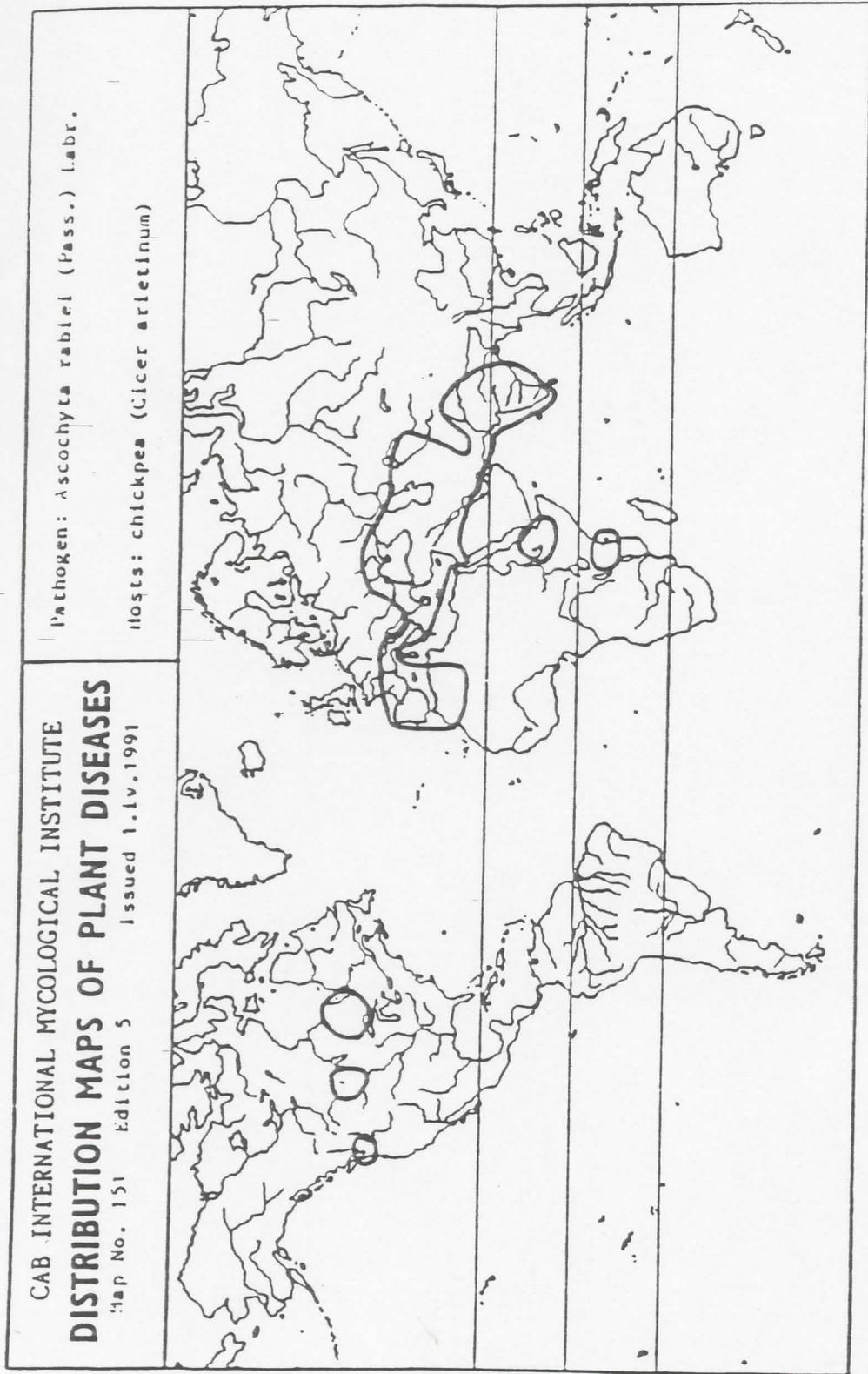


Fig 2: Répartition mondiale d'*A. rabiei* (CAB International Mycological Institut)

#### 2.2.4- Variabilité d'*Ascochyta rabiei*

Les études montrent que le champignon *Ascochyta rabiei* possède une pathogénécité très variable. L'existence de races physiologiques a été signalée dès 1969 par **Bedi et Aujla**. **Vir et Grewal**, en 1974 ont identifiés deux races (race 1 et 2) et un biotype de la race 2. **Reddy et Singh** en 1983, ont identifié 4 races et 4 biotypes de ces races suivant les réactions de 18 génotypes différentiels. En 1985, **Reddy et Kabbabeh** ont défini 6 races physiologiques du champignon selon les réactions différentielles de 6 génotypes de Pois chiche. Une étude sur la variabilité géographique d'*A. rabiei* montre que les différences de pathogénécité des isolats seraient attribuées plutôt à une variation dans l'agressivité (**Gowen et al., 1989**). **Hamidullah et Wiese** en 1991, dans une étude pour classer 39 isolats en races, ont détecté 11 formes de virulences; 9 des isolats ressemblaient aux 6 races de l'I.C.A.R.D.A et seraient très virulents. Ils conclurent que la population d'*A. rabiei* dans le Palouse est composée de formes différentes de virulences.

L'existence d'une interaction différentielle entre les 6 races d'I.C.A.R.D.A et des lignées de Pois chiche n'a pas été complètement confirmée par l'étude de **Labdi** (1995), qui montre que celle-ci est plutôt du type non spécifique. Il classe les 6 races en deux groupes de pathogénie (race 6-4 et 1-5-2-3) dans lesquels l'agressivité est plus prépondérante que la virulence. En plus, les lignées ont une résistance incomplète et sont sensibles aux conditions de l'environnement, ce qui a rendu difficile la mise en évidence des comportements différentiels stables.

#### 2.2.5- Méthodes de lutte

La méthode de lutte la plus utilisée reste la lutte chimique. Elle concerne le traitement des semences qui agit sur la phase de transmission de l'agent pathogène des graines aux plantules et le traitement en végétation qui tente d'éviter la contamination des gousses et donc des nouvelles graines.

Malgré l'importance de la contamination des semences dans l'apparition de la maladie, la lutte par des techniques culturales appropriées est à prescrire pour diminuer l'inoculum primaire. Aussi, **Reddy** (1984) préconise le semis à 10cm, ce mode qui rend l'inoculum transmis par la semence inactif à cette profondeur, comme il préconise également la rotation, avec l'alternance du Pois chiche avec les céréales, et le labour profond pour prévenir l'inoculum à partir des débris malades provenant des cultures précédentes.

Actuellement l'utilisation de cultivars tolérants à résistants, apparaît être le meilleur moyen pour contrôler la maladie.

Plusieurs sources de résistances ont été relevées chez les types Desi et Kabuli. Seulement, l'utilisation de variétés résistantes exerce une pression de sélection sur la population parasite qui conduit à l'apparition de nouvelles races ou pathotypes capables de contourner cette résistance. En effet, *Ascochyta rabiei* possède une grande variabilité pathogénique en raison de l'existence de plusieurs races physiologiques ou pathotypes (**Bedi et Aujla, 1969 ; Vir et Grewal, 1974 ; Reddy et Singh, 1983 ; Reddy et Kabbabeh, 1985 et Labdi, 1995**).

### 3.- Résistance du Pois chiche à *Ascochyta rabiei*

#### 3.1- Sur le plan génétique

Il existe des cultivars de Pois chiche avec des niveaux variés de résistance ce qui montre que la génétique de la résistance à *A. rabiei* est polygénique conférant ainsi différents degrés de résistance face au pathogène (Mohammed Bashir, 1984). La résistance polygénique non spécifique est nettement plus difficilement contournable par les parasites. Selon Peters et Tahiri (1986), la résistance peut être estimée sur différents organes et à différents stades de développement de la plante. Selon les mêmes auteurs, il existe parfois des variations entre la résistance au stade végétatif et la résistance au stade producteur, ce qui indique que plusieurs loci peuvent participer à la résistance à l'anthracnose. Ces résultats ont été confirmés plus tard par Labdi (1995). Son étude a montré que cette résistance peut être partielle, s'exprimant différemment selon les stades physiologiques de la plante et régresserait après le stade floraison. Elle serait de nature récessive, sous le contrôle de 2 à 4 gènes, et serait déterminée par des gènes différents selon les stades physiologiques.

#### 3.2.- Sur le plan pathologique

Vir et Grewal (1974 ,b) font apparaître une forte corrélation positive entre les attaques sur tiges et feuilles des variétés sensibles, mais non sur les variétés résistantes. Chez ces dernières, les feuilles sont très peu attaquées par rapport aux tiges. Ils concluent que l'attaque de la tige est un critère plus approprié pour les classements des variétés (Ameziane, 1981). Sattar (1933) considère qu'une sécrétion élevée d'acide malique par les feuilles au stade floraison-fructification, favorise l'infection (Nene et Reddy, 1987). Par contre Hafiz (1952) trouve que le cultivar F8 secrète plus d'acide malique qu'un cultivar sensible (Pb-7) et que l'acide malique est un inhibiteur de la germination des spores et du développement du tube germinatif. Une autre étude menée à ICRISAT, n'indique pas de différence dans la germination de spore et le développement du tube germinatif dans les exsudats des cultivars résistants et sensibles (Nene et Reddy, 1987).

Hafiz (1952) ne trouve pas de différence d'épaisseur de la cuticule entre les types résistants et sensibles, mais l'acidité de la sève du type résistant est plus élevée comparée à celle du type sensible. La même année, Ahmed et al (1952) signalent un nombre de poils par unité de surface au niveau de la tige et de la feuille plus élevé et plus ramifié chez le type résistant par rapport aux types sensibles. D'autre part, dans une série de travaux de Vir et Grewal (1974 b,1975), en comparant un cultivar résistant et un autre sensible du point de vue biochimique, trouvèrent que le cultivar résistant montre une activité peroxydase et catalase élevée, avec une accumulation des composés phénoliques et du L-cystine, suite à une inoculation artificielle. Ameziane (1981) note que les processus de lignification des fibres péricycliques et du parenchyme profond protégeant de la macération les vaisseaux et la moelle, sont des mécanismes importants de la résistance pratique du cultivar tolérant.

Parmi les composés de défense de la plante, les phytoalexines qui sont accumulés durant l'infection seraient le pterocarpan médicarpin et maackiain selon **Weigand et al.** (1986). Ces auteurs montrent une corrélation élevée entre l'accumulation de ces phytoalexines et le degré de résistance des cultivars.

Les composés phénoliques jouant un rôle antifongique seraient des isoflavones biochanin A et formononetin (**Weigand et al.**, 1986).

#### **4.- Détection d'activités enzymatiques et de toxines chez *Ascochyta rabiei***

Lors d'une interaction compatible entre une plante et un agent pathogène, des métabolites nécessaires au développement de la maladie peuvent être sécrétés par l'agent infectant. Parmi ces substances, les enzymes hydrolytiques constituent avec les toxines, les principales armes des champignons parasites pour infecter les plantes (**Bateman et Basham, 1976 ; Auriol, 1979**).

##### **4.1- Production d'enzymes hydrolytiques par *Ascochyta rabiei***

###### **4.1.1.- Caractéristiques des constituants de la paroi cellulaire et dégradation enzymatique**

La paroi cellulaire des plantes hôtes joue un rôle nutritionnel au cours de la pathogénèse 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 (**Bateman, 1976**).

###### **4.1.1.1- Les principaux polysaccharides constitutifs**

###### **a.- La cellulose**

Constituant majeur de la paroi cellulaire des plantes supérieures, c'est une substance squelettique constituée par une structure fibrillaire. Chimiquement, c'est un polymère de glucose couplé par une liaison  $\beta(1-4)$  (**Bateman, 1976**).

###### **b.- Les hémicelluloses**

Ces constituants accompagnent les composés pectiques dans la matrice. Ce sont des hétéropolymères de 5 à 6 sucres différents. La chaîne principale est composée du D-xylose, D-manose, D-galactose, liés par

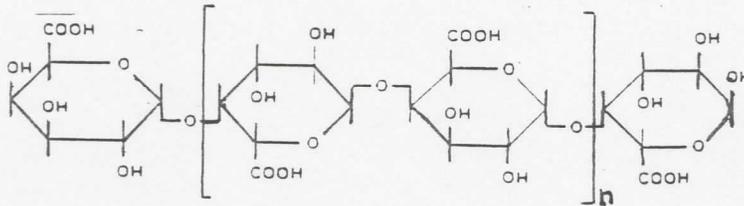
des liaisons  $\beta$  (1-4). La chaîne secondaire est composée par du L-arabinose, l'acide méthylglucuronique, le D-glucose, et le D-galactose, reliés par différents types de liaison:  $\alpha$  (1-4);  $\beta$  (1-3);  $\beta$  (1-4);  $\beta$  (1-6). Lorsque l'un de ces sucres prédomine, les composés seront des xylanes, mannanes, galactomananes, galactanes, amidon etc... Le xylane est le composé le plus important (Agrios, 1988).

### c.- Les substances pectiques

Comme composant de la lamelle moyenne, les substances pectiques forment un "ciment" qui relie les cellules les unes aux autres.

Le motif manomère des substances pectiques est l'ester méthylique de l'acide  $\alpha$ -D-galacturonique. Le squelette de toutes les substances pectiques est donc formé par des acides liés en  $\alpha$  (1-4). Cette chaîne constitue l'acide polygalacturonique ou acide pectique. Elle possède une extrémité réductrice puisque le carbone (1) du motif monomère terminal de droite porte une fonction pseudo-aldéhydique non engagée dans une liaison (Rexova-Benkova et Marcovic, 1976 ; Thibault, 1980).

Structure de l'acide galacturonique (Thibault, 1980)



L'axe principal contient du Rhamnose, la nature de ses liaisons sont du type (1-->4) et (1-->2) avec l'acide galacturonique:  $\alpha$  -D-galacturonique 1-2- $\beta$ L-Rhamnose 1-->4 a. $\alpha$ -D- $\beta$  galacturonique (Rexova-Benkova et Marcovic, 1976 ; Thibault, 1980).

#### 4.1.1.2.- Les principales enzymes hydrolytiques

Les activités enzymatiques d'origine fongique connues pour avoir un rôle dans la dégradation de la paroi cellulaire, sont spécifiques à chacun des constituants chimiques de cette structure : les enzymes cellulolytiques qui sont impliquées dans la conversion de la cellulose et les pectolytiques qui dégradent les constituants pectiques, sont les principales enzymes impliquées dans la pathogénèse (Cooper, 1984).

#### 4.1.1.2.1- Les enzymes cellulolytiques

La conversion de la cellulose en glucose implique un complexe d'enzyme désigné par C1 et Cx et la cellobiase. La cellulose en état natif est insoluble, et partiellement cristalline. La C1 convertit la cellulose native en cellulose sensible aux enzymes du type Cx. La Cx ou endo- $\beta$ -1,4 gluconase découpe la chaîne de cellulose, et la cellobiase convertit la cellobiose en glucose (Bateman, 1976, Cooper, 1984).

#### 4.1.1.2.2- Les enzymes pectolytiques

Les enzymes pectiques sont largement répandues chez les plantes supérieures, les bactéries, les champignons et insectes. Elles jouent un rôle important comme agent de macérations des tissus végétaux.

##### a.- Classification

Les enzymes pectolytiques se divisent en deux grands groupes:

Les enzymes saponifiantes et les enzymes dépolymérisantes:

- **Les enzymes saponifiantes** hydrolysent les liaisons esters méthyliques. Il s'agit de la pectine-méthyl-estérase (ou pectinestérase, PE, EC.3.1.1.11); elle libère du méthanol et forme des pectates ou acides pectiniques (Rexova-Benkova et Marcovic, 1976 ; Thibault, 1980).
- **Les dépolyméras** assurent la dégradation des macromolécules des cellules hôtes en molécules plus simples. Leur classification repose sur trois critères:
  - Le substrat préférentiel: pectine ou acide pectique
  - Le mode d'action: action au hasard (endo-enzyme) ou action récurrente à partir de l'extrémité réductrice ou non réductrice du substrat (exo-enzymes).
  - La réaction mise en jeu au cours de la polymérisation: hydrolyse (galacturonases) ou  $\beta$ -élimination (lyases).

Suivant cette classification, il existerait 8 enzymes dépolymérisantes:

- 4 hydrolases,
- 4 enzymes opérant par  $\beta$ -élimination (pectate lyase ou trans-éliminase) (Tableau 3).

**Tableau 3:** Classifications des enzymes dépolymérisantes des substances pectiques  
(Rexova-Benkova et Marcovic, 1976 ;Thibault, 1980).

1- Enzymes attaquant préférentiellement les pectines:

Polyméthylgalacturonases (PMG)	Pectine-lyases (PL)
endo PMG	endo PL (E.C 4.2.2.3)
exo PMG	exo PL

2- Enzymes attaquant préférentiellement les acides pectiques:

Polygalacturonases (PG)	Pectate-lyases (PAL)
endo PG (E.C. 3.2.1.15.)	endo PAL (E.C 4.2.2.1)
exo PG (E.C. 3.2.1.40.)	exo PAL (E.C. 4.2.2.2)
et (E.C. 3.2.1.82.)	

Seulement cinq des dépolymérasés sont actuellement recensés:

- **L'endopectine-lyase (endo PL, EC.4.2.2.3)** ; seule enzyme capable de dépolymériser directement les pectines.
- **Pectate-lyases (endo PAL, EC.4.2.2.1 et exoPAL 4.2.2.2).**
- **Les polygalacturonases (endo PG, EC.3.2.2.15 et exo PG, EC.3.2.1.40 et EC 3.2.1.82).**

Ces enzymes ne peuvent dépolymériser respectivement par  $\beta$ -élimination et hydrolyse, que des pectines préalablement saponifiées ou estérifiées (Rexova-Benkova et Marcovic, 1976 ;Thibault, 1980).

#### b.- Caractéristiques et propriétés

Les pectinestérases (PE) et les polygalacturonases (PG) sont répandues dans le règne végétal et chez les micro-organismes, alors que les lyases sont exclusivement d'origine microbienne. L'optimum du pH d'action pour les différents groupes d'enzymes serait de: (Thibault, 1980)

<b>PG</b> (endo PG et Exo PG) et <b>PE</b> d'origine fongique:	pH 4 à 6.5
<b>PE</b> d'origine végétale ou bactérienne:	pH 7 à 8
<b>PL</b> :	pH 9.5 à 10.5
<b>PAL:</b>	pH 8 à 10

L'optimum du pH des PL change en fonction du milieu. Quand le milieu est un extrait de plante, l'optimum est à pH 9 pour toutes les formes de PL.

L'activité enzymatique est fortement influencée par la présence d'ions monovalents ou divalents. Ainsi les ions monovalents à faible concentration activent en général les PE et les PG, et les ions divalents ( $\text{Ca}^{++}$ ) activent les lyases (Thibault, 1980 ; Bugbee, 1990).

Le pH isoélectrique est variable selon les enzymes et leurs formes et selon l'espèce d'origine. Par exemple, pour le cas du *Colletotrichum lindemuthianum*, il se situe au pH 6.4 à 8 pour les endo PG, à pH 4.2 pour les exo PG et à pH 9 pour les PL (Pérez Artés et Tena, 1990).

Il peut y avoir des formes multiples pour la même enzyme et cette possibilité a été mentionnée dès 1934 par Brown (Byrde, 1982). L'habilité qu'ont les micro-organismes parasites des plantes à produire des formes multiples de différents types d'enzymes pectiques, est relativement commune. Ce fait peut donner avantage au pathogène et ainsi, il peut être plus adapté au changement des conditions environnantes. A cause de quelques isoenzymes, ils peuvent être plus actifs ou stables à l'intérieur des plantes hôtes que d'autres (Pérez Artés et Tena, 1990). Les différentes formes peuvent être aussi responsables des syndromes différents tels que le jaunissement et le flétrissement. Chaque forme peut être adaptée à une situation environnementale particulière; elle confère l'adaptation à l'organisme. Ainsi, elles ont une signification écologique (Hancock, 1976; Byrde, 1978).

### c.- Implication des enzymes pectiques dans la pathogénèse : rôle dans la mort du protoplaste

L'implication de ces enzymes pectiques dans la pathogénèse a été déjà signalée par Jones (1909) et Brown (1915) cité par Mussell (1977). Actuellement, il est universellement admis que ces enzymes sont responsables de la macération des tissus communément appelée "pourriture" (Bateman, 1976).

En plus de ce rôle, ces enzymes peuvent être impliquées dans la cause de la mort des cellules qui accompagne souvent la pourriture molle (Mussell, 1977).

Selon Mussell (1977), les effets physiologiques de ces enzymes peuvent être expliqués sur la base, soit d'un effet direct ou d'un mécanisme indirect. Ces concepts ont été choisis pour expliquer la différence de fonctionnement des enzymes pectolytiques chez les maladies biotrophiques et les maladies necrotrophiques.

Le mécanisme indirect est caractérisé par l'implication, soit d'une toxine comme produit final de la dégradation de la paroi cellulaire ou comme le résultat d'une activation des enzymes reliées à la paroi à travers leur solubilisation. C'est un phénomène plus lent avec un temps distinct entre l'application des enzymes pectiques et l'apparition des cellules nécrosées (symptômes). Les effets indirects des enzymes pectiques produites par le pathogène sont responsables pour beaucoup, des symptômes observés dans le syndrome du flétrissement vasculaire (Mussell, 1977).

Le mécanisme direct est caractérisé par la rapidité des effets de ces enzymes sur les cellules, qui se traduit par une perte d'eau et d'électrolytes des tissus (Mussell, 1977). Selon Wood (1972) la dégradation enzymatique des parois cellulaires des plantes par les enzymes pectiques, rend les parois incapable de supporter mécaniquement le protoplaste. Dans une étude faite par Tseug et Mount (1974), il apparaît que la sensibilité des cellules de plantes à l'effet des endopectinylases est reliée à la présence des parois cellulaires autour des cellules vivantes. La paroi cellulaire est donc un facteur critique dans la mort des protoplastes.

#### 4.1.2- Détection des activités enzymatiques chez *Ascochyta rabiei*

*Ascochyta rabiei* se comporte comme un parasite nécrotrophe: il provoque à distance une macération précédée par des réactions des noyaux et par des modifications de la perméabilité cellulaire. L'étude des modalités de résistance d'un cultivar de Pois chiche a mis en évidence une action pectinolytique et une dégradation de la cellulose plus évidente dans les tissus vasculaires que dans le parenchyme (Ameziane, 1981). Une étude sur l'activité enzymatique *in vitro* d'isolats algériens a révélé la production d'une gamme d'enzymes de macération en milieu liquide. Ces enzymes sont du groupe des amylases, des protéases, des polygalacturonases (PG), des pectines méthylestérases (PME) et des cellulases (Tchicha, 1991). (Tableau 4).

El Biari (1995), dans son étude sur la variabilité morphologique et culturale d'*A. rabiei*, note l'influence positive sur la croissance de la présence de la paroi cellulaire du Pois chiche comme source de carbone. Il conclue que le champignon est capable de dégrader les parois cellulaires en sucres simples, probablement en produisant des enzymes pectinolytiques.

**Tableau 4:** Activité enzymatique dépolymérisante sécrétée *in vitro* par *Ascochyta rabiei* (Tchicha, 1991)

Milieu liquide Activités enzymatiques	Mathur	Diffusat P.C	Pectine	Technique
Amylases	+++	+++	++	Cup plate
Polygalacturonases	++	++	+++	Cup plate
Cellulases	-	-	-	Cup plate
Hémi-cellulases	-	-	-	Cup plate
Protéase	++	n	n	Cup plate
Pectine méthylestérases	n	++	+++	Titration
Endo-polygalacturonases	+++		+++	Viscosimétrie
Endo-PMG	++		++	Viscosimétrie
Endo-cellulases	+++		+	Viscosimétrie

+++ : Forte activité

- : Activité non décelée

n : Non effectué

## 4.2.- Production de phytotoxines par *Ascochyta rabiei*

Le terme de phytotoxine a été employé dans la définition de **Strobel (1974)** : c'est-à-dire un composé quelconque produit par le parasite et qui perturbe le métabolisme de l'hôte.

Les symptômes observés sur les folioles, pétioles et jeunes branches, telles que l'épinastie, la perte de turgescence suivie par une infiltration d'eau sont associés à l'action des toxines. Ces toxines ont été identifiées comme étant des phytotoxines non spécifiques: les solanapyrones A et C et de cytochalasine D. Ces toxines ne sont synthétisées *in vitro* qu'en présence d'extraits de cellules des feuilles de Pois chiche (**Allam et al, 1989 ; Hohl et al., 1991 ; Chen et Strange, 1991 ; Latif et al., 1993**).

## 5.- Variabilité protéique et enzymatique chez *Ascochyta rabiei*

### 5.1.- Protéines et caractérisation des organismes

Les protéines sont les moyens d'expression de l'information génétique (**Lehninger, 1985**). Il existe un très grand nombre de protéines différentes dans l'organisme, chacune assurant une fonction spécifique déterminée par son gène.

Les difficultés de caractérisation de la variabilité des organismes à partir des seuls critères morphologiques, ont conduit à l'utilisation de l'électrophorèse des protéines. Les isoenzymes ou « formes multiples d'une enzyme » ont une base moléculaire déterminée (**Markert, 1968**). L'étude du polymorphisme est mis en évidence avec plus de spécificité par le profil électrophorétique des isoenzymes chez un organisme.

### 5.2.- Etude électrophorétique des protéines et des isoenzymes chez *Ascochyta rabiei*

L'étude des profils des estérases par **Labdi (1990)**, a permis de mettre en évidence des différences entre les isolats étudiés et les a classés en groupes. Cette étude a montré l'influence des milieux de culture sur le nombre des bandes révélées au niveau des profils protéiques et des estérases.

Ce polymorphisme isoenzymatique a été confirmé par **El Biari (1995)** en utilisant la technique de l'isoélectrofocalisation à l'aide de 13 systèmes enzymatiques. Il a aussi mis en évidence cette variabilité au niveau génétique par une caractérisation basée sur des marqueurs moléculaires répartis au hasard dans le génome à l'aide de la technique RAPD (« Random Amplified Polymorphic DNA »), effectuée sur 75 isolats de différentes localités géographiques. Les marqueurs polymorphiques ont révélé l'existence de 5 groupes d'isolats; et aucune corrélation entre la diversité génétique, les structures pathogéniques et les origines géographiques n'est établie.

## 6.- Conclusion et présentation du sujet

Cette revue bibliographique nous indique que face à cette maladie, il n'existe pas véritablement de méthodes de lutte satisfaisantes puisque la lutte culturale, le contrôle sanitaire des semences et même les traitements chimiques des semences en végétation s'avèrent insuffisants. La création du matériel végétal tolérant, voire résistant, doit être privilégiée pour permettre avec les méthodes déjà existantes d'atteindre un niveau sanitaire satisfaisant. Seulement, la résistance variétale peut parfois être mise en échec par des populations parasites constituées d'individus aux potentiels génétiques différents.

Les études sur la physiologie des maladies fongiques et des relations hôte-parasite montrent des aspects intéressants sur le comportement du pathogène *in vivo* et *in vitro*. Celles-ci peuvent mettre en évidence l'inhibition des toxines ou enzymes du pathogène par les anti-métabolites de l'hôte, et l'existence d'une relation entre le niveau de résistance et l'inhibition de ces métabolites par la plante. Ces aspects qui n'ont pas encore été éludés chez le couple *Ascochyta rabiei*/Pois chiche pourraient, s'ils venaient à être étudiés, contribuer à mieux connaître cette maladie.

Dans cette optique, le but de notre étude est d'apporter des données sur la biologie et la pathologie du champignon.

D'abord, une évaluation des activités enzymatiques du champignon *in vitro* a été faite avec l'étude des facteurs favorisant cette sécrétion. Les groupes d'enzymes en relation avec la pathologie ont été évalués *in vitro* et *in vivo* sur cultivars sensibles et résistants. Et enfin, une étude électrophorétique a permis de dresser des profils protéiques et des zymogrammes des différents groupes d'enzymes.

## *CHAPITRE II*

### *Matériel et méthode*

## 1- Matériel biologique

### 1.1- L'hôte

L'étude du pouvoir pathogène des isolats s'est faite sur 7 cultivars, dont 2 connus pour leur sensibilité à l'anthracnose (Sebdou et Rabat 9) ont servi à la production de l'inoculum frais (Tableau 5).

Tableau 5: Liste des cultivars de Pois chiche

N°	Nom	Type	Origine	Couleur de la semence
1	ILc-182	Gulabi	URSS	Beige
2	ILc-200	Gulabi	URSS	Beige
3	ILc-1929	Kabuli	Syrie	Beige clair
4	ICc-3996	Desi	Iran	Ocre à marron
5	ICc-4107	Desi	Iran	Noir
6	Sebdou	Kabuli	Locale	Beige
7	Rabat 9	Kabuli	Locale	Beige

### 1.2- Le matériel fongique

#### 1.2.1- Origine des isolats

Les 8 isolats étudiés nous ont été fournis par le Dr Bouznad. Leur origine géographique est mentionnée dans le tableau 6.

Tableau 6: Origine géographique des souches

Région	Nom de l'isolat	Abréviation
Plaine de l'ouest	Ain Témouchent	AT
	Sidi Belabbès (89-07)	8907 SBA
	Tessala	Tess
	Sig	Sig
Hauts plateaux de l'ouest	Tiaret (89-08)	Tia
	Hattab (89-01)	Hatt
Centre	Tizi ouzou	TO
Plaine de l'est	Guelma	90.03

## 2- Etude du pouvoir pathogène des isolats

### 2.1- Les milieux de culture

L'inoculum a été produit sur milieu gélosé; le milieu Mathur (Mathur et al, 1950) dont la composition est présentée en annexe 1. Ce milieu favorise une sporulation maximum. Le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri de 9cm de diamètre à raison de 18ml chacune. Les boîtes sont ensemencées pour la production d'inoculum et mises à incuber entre 18° et 22° c à lumière continue.

### 2.2- Conditions d'obtention des plantules

Les graines des variétés utilisées sont prétraitées à l'hypochlorite de sodium à 5% pendant 5mn puis rincées dans 3 bains successifs d'eau stérile. Ces graines sont mises à prégermer dans des boîtes de Pétri entre deux feuilles de papier buvard stériles imbibées d'eau puis incubées à 20°c durant 72h.

Cinq (5) graines par génotypes sont repiquées dans des pots de dimensions 20x30 cm, préalablement remplis de substrat horticole stérile. Un témoin sensible de 5 graines par isolat est utilisé. Les pots sont placés dans une serre dans laquelle la température varie entre 15 et 28°c. L'irrigation des bacs a lieu une fois tous les 3 jours par une solution nutritive KNOP.

### 2.3- Inoculation des plantes

Les isolats sont, dans un premier temps, inoculés sur une variété sensible (Rabat 9) afin de régénérer leur pouvoir pathogène. A partir d'organes présentant des pycnides, les champignons sont réisolés et cultivés en boîte de Pétri sur milieu Mathur. Après 10 à 15 jours de culture, les colonies sont submergées par de l'eau distillée stérile et grattées avec une pipette Pasteur coudée pour mettre un maximum de spores en suspension. Une goutte de Tween 80 permet d'avoir une suspension de spores homogène. La concentration est ajustée à  $10^6$  spores/ml à l'aide de la cellule de Malassez (Labdi, 1990; Yanina, 1990).

La contamination a lieu au stade 3 feuilles (7 jours après germination) par pulvérisation d'une suspension de spores du champignon à la concentration indiquée. Chaque plantule reçoit entre 3 et 5 ml de cette suspension. Les pots sont recouverts par un film plastique durant les 3 jours qui suivent l'inoculation et plusieurs pulvérisations d'eau sont effectuées sur les plantes. Le film plastique est retiré après l'apparition des premiers symptômes.

## 2.4- Notations et traitement des données

Une seule notation finale est réalisée quand le génotype utilisé comme témoin sensible a atteint la note maximale sur l'échelle d'évaluation des symptômes. L'échelle d'évaluation des symptômes de **Reddy et Singh (1984)** est utilisée:

- 1: plantes saines
- 2: 5% des organes touchés
- 3: 6 à 10% des organes touchés
- 4: 11 à 15% des organes touchés
- 5: 16 à 40% des organes touchés
- 6: 41 à 50% des organes touchés
- 7: 51 à 75% des organes touchés
- 8: 76 à 100% des organes touchés
- 9: plantes détruites

Le traitement des données a été effectué par le logiciel STATITCF conçu par l'Institut Français des Techniques des Cultures Fourragères. Le traitement consistait à introduire les données selon un plan d'essai bien déterminé et de procéder, par la suite, à une analyse de la variance avec, éventuellement un test de comparaison des moyennes. Le test retenu est celui de Newman-Keuls aux seuils 5 et 1%.

L'analyse portait sur la note attribuée à chaque pot, celle-ci correspond à la moyenne des notes des 5 plantes par pot.

## 3- Etudes des activités enzymatiques

### 3.1- Obtention des filtrats de cultures

#### 3.1.1- A partir des filtrats de culture

##### 3.1.1.1- Milieux liquides

Afin d'étudier l'influence de la source de carbone sur l'activité enzymatique *in vitro*, 3 milieux sont testés: milieu Mathur avec, comme source de carbone, le glucose ou la pectine et le milieu diffusât de Pois chiche (compositions présentées en annexe 2 ).

Les milieux liquides sont répartis dans des erlenmeyers de 300ml avec 100ml de milieu par flacon, puis autoclavés pendant 30mn à 105°C.

### 3.1.1.2- Ensemencement des cultures

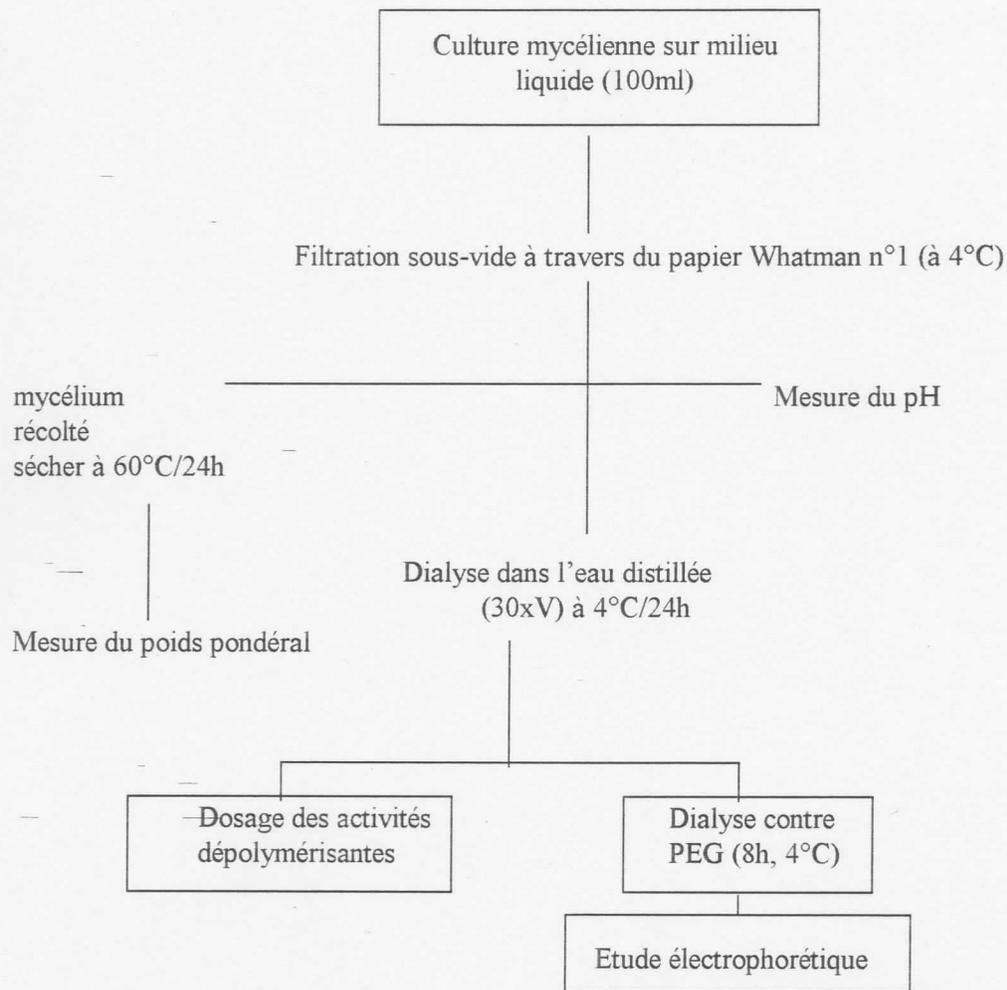
L'ensemencement des milieux se fait aseptiquement avec l'introduction d'1 ml d'une suspension de spores à  $10^7$  spores/ml, obtenue à partir d'une culture âgée d'environ 10 jours. Les cultures sont mises à incuber à 5 périodes différentes (24h, 48h, 72h, 6j, 9j) à température ambiante (18 à 22°C) avec un éclairage alterné, sur agitateur latéral à 250 périodes/mn.

### 3.1.1.3- Méthode de filtration

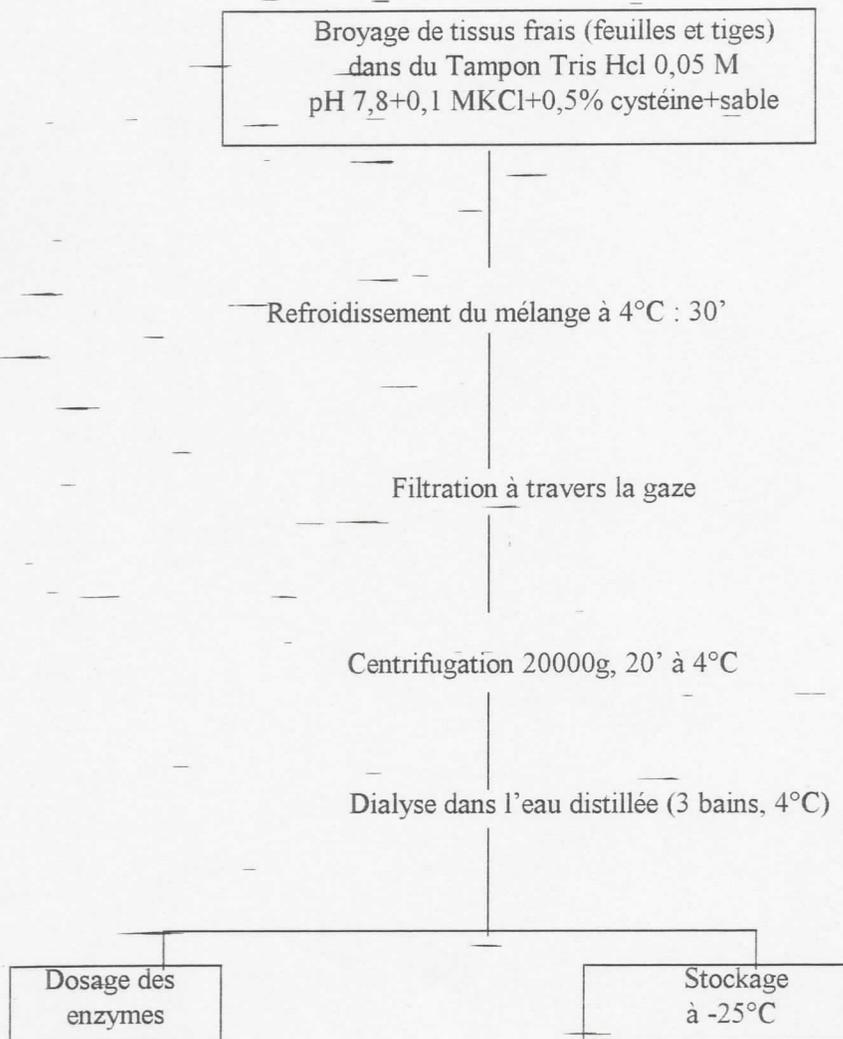
Pour chaque période d'incubation, le contenu est récolté par filtration sous vide à 4°C, à travers du papier filtre Whatman n°1. Après mesure du pH, le filtrat est dialysé contre de l'eau distillée (30 fois le volume du filtrat) à 4°C pendant 24h. Le filtrat est ensuite récolté et conservé en aliquot d'1 ml à -25°C jusqu'à analyse. Après chaque filtration le mycélium est récupéré et séché à l'étuve à 60°C durant 24h. Le poids pondéral qui détermine la croissance du mycélium est ainsi obtenu. Une partie du filtrat dialysé sera concentrée contre du polyéthylène glycol 20.000 (P.E.G), jusqu'à 30 fois son volume initial et servira aux études électrophorétiques (Fig 3).

### 3.1.2- A partir de tissus frais parasités ou non

Deux variétés, l'une sensible ILC-1929, l'autre moyennement résistante ICC-3996 sont inoculées par deux isolats, l'un, d'une agressivité relativement faible (Sig), le deuxième d'agressivité élevée (Tess). Les traitements des tissus se fait pour 4 périodes d'incubation: 3j, 6j, 9j, 15j selon le protocole décrit par la figure 3. Pour chaque période, 3 plantes sont traitées. Les tissus sont broyés dans un mortier en présence de sable fin à raison d'un gramme (1g) de tissu par ml de tampon Tris-HCl à 0.05 M et pH 7.8, contenant 0.1M KCl et 0.5% de cystéine. Le mélange d'extraction est laissé durant 30mn à 4°C, puis filtré et centrifugé à 20.000g pendant 20mn à 4°C. Le filtrat est dialysé contre plusieurs changes d'eau distillée à 4°C (Marciano et al, 1982). Des tissus sains des deux variétés et du même âge que les périodes d'incubation des tissus inoculés, subissent le même traitement et serviront de témoins.



**Fig 3:** Protocole d'extraction des protéines extracellulaires à partir du filtrat



**Fig 4:** Protocole d'extraction des enzymes à partir des tissus inoculés

## **3.2- Dosage des enzymes**

### **3.2.1- Les enzymes extracellulaires: le test APIZYM**

#### **3.2.1.1- Principe**

Le système Apizym est une micro méthode semi-quantitative de recherche d'activités enzymatiques applicable à tous les milieux (tissus, cellules, liquides biologiques...). Il permet d'étudier rapidement et simultanément dix neuf (19) activités enzymatiques à partir de très faibles quantités d'un échantillon. Il se présente sous forme d'une galerie de vingt micro cuves (cupules), dont le fond est constitué d'un support spécialement préparé contenant le substrat enzymatique avec un tampon (Prospectus, APIZYM).

#### **3.2.1.2- Mode opératoire**

La galerie est mise dans la boîte d'incubation (avec fond et couvercle). Dans chaque cupule, 65µl de filtrat d'enzymes sont déposées. La boîte fermée, est mise à incuber à 37°C durant 4h environ (Prospectus, APIZYM).

#### **3.2.1.3- Lecture de la galerie**

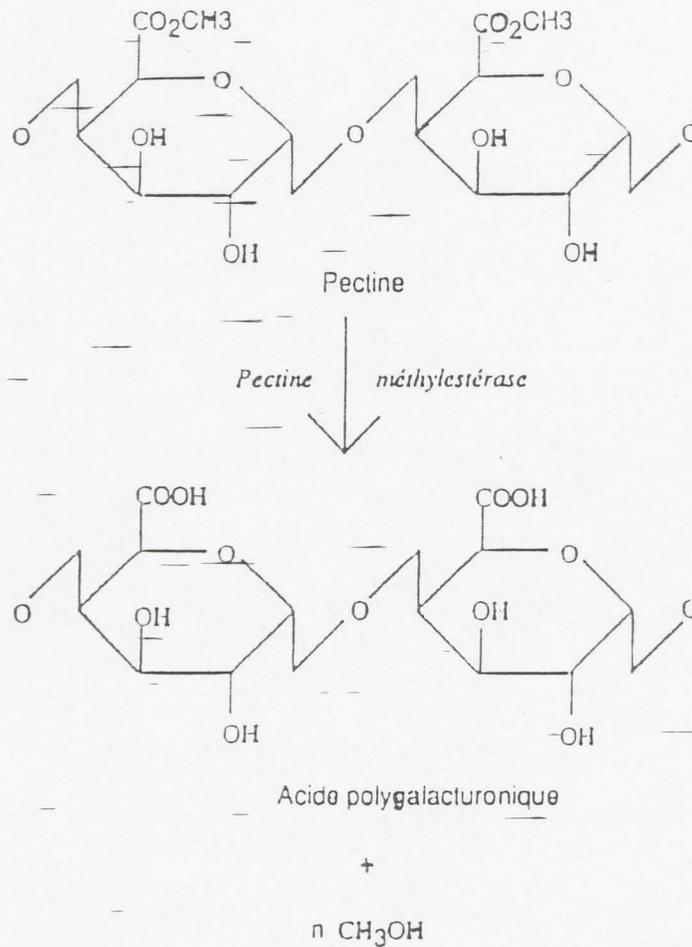
Après incubation, une goutte du réactif Zym A et une goutte du réactif Zym B sont ajoutées dans chaque cupule (composition des réactifs est présentée en annexe 3). La coloration se développe après 5 mn. La lecture se fait en notant les résultats de 0 à 5 sur une fiche en s'aidant d'une échelle jointe avec le KIT APIZYM. La note 0 correspond à une réaction négative, la note 5 à une réaction d'intensité maximum, les réactions intermédiaires étant notées 1-2-3 et 4.

### **3.2.2- Les enzymes dépolymérisantes**

#### **3.2.2.1- La Pectine méthyl estérase (PME)**

La PME catalyse l'hydrolyse de l'ester méthylique de la pectine. Il en résulte la libération de la fonction carboxylique en C6 des unités galacturoniques et la formation de méthanol (une molécule par unité d'acide galacturonique préalablement estérifiée). La réaction peut donc être quantifiée soit par dosage du méthanol, soit par acidimétrie. C'est cette dernière technique qui a été choisie.

\* Schéma de la réaction enzymatique

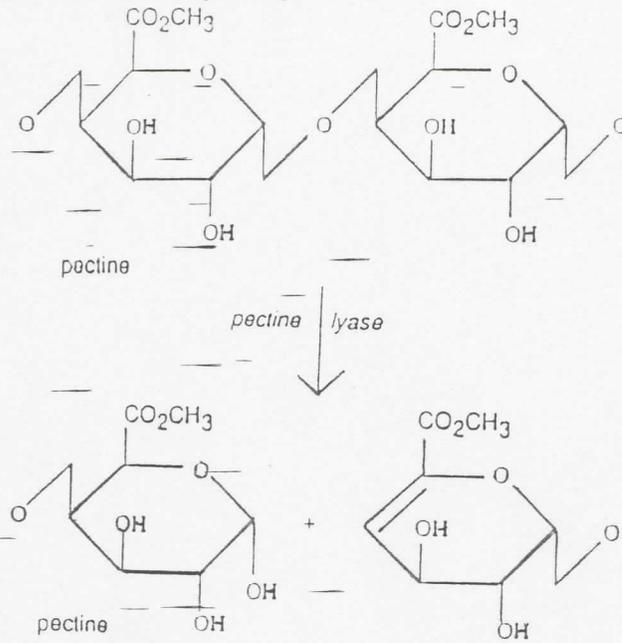


3.2.2.2- Les Pectines lyases (PL)

La Pectine lyase est une enzyme qui provoque la rupture de la liaison osidique par trans-élimination du proton en C<sub>4</sub>; il en résulte la formation d'une double liaison C<sub>4</sub>=C<sub>5</sub> au niveau de l'unité (n+1) et la libération de la fonction pseudo-aldéhydique (groupement réducteur) au niveau de l'unité (n). La réaction enzymatique entraînant une augmentation du pouvoir réducteur du milieu, elle peut être mesurée par deux méthodes; celle de **Miller** (1959) et celle de **Somoggi-Nelson** (**Nelson, 1944**) avec les recommandations de **Marais et al** (1966).

Par ailleurs, la double liaison C<sub>4</sub>=C<sub>5</sub> étant caractérisée par une absorption à 235nm, une méthode de dosage de l'activité enzymatique consiste à mesurer l'évolution de la densité optique du milieu réactionnel à cette longueur d'onde (**Tsuyumu, S. et Chatterjee, A.K., 1984**).

\* Schéma de la réaction enzymatique

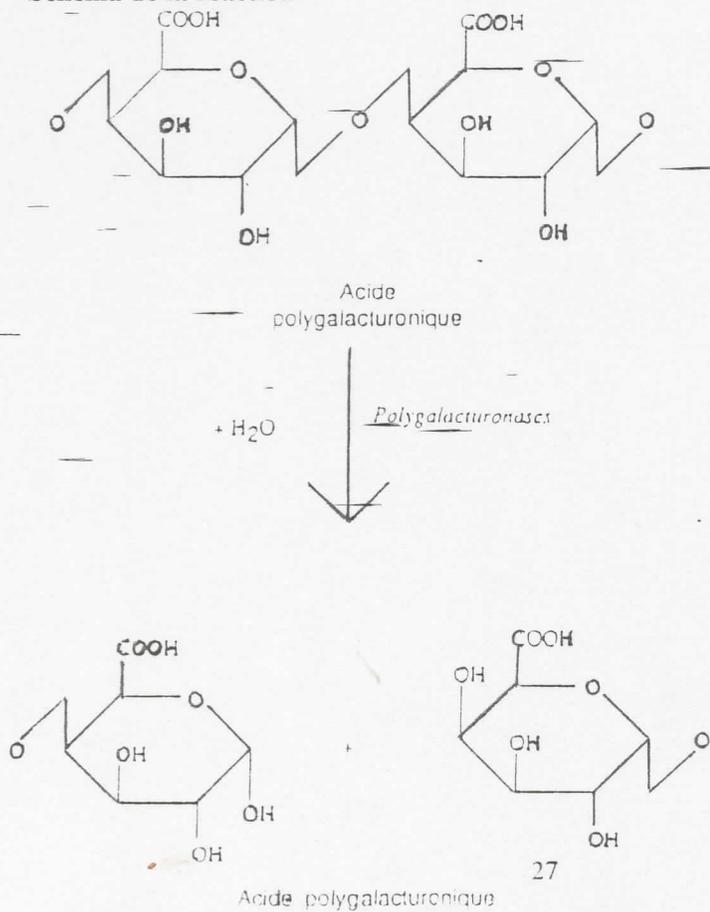


3.2.2.3.- Les Polygalacturonases (PG)

Les polygalacturonases sont des enzymes qui effectuent la rupture de la liaison intermonomérique par voie hydrolytique (et non pas trans-éliminasique comme les lyases).

Elles agissent sur les acides pectiques et les acides polygalacturoniques. Deux formes d'activité existent: type "endo" (mesuré par viscosimétrie) et le type "exo" (test par dosage du pouvoir réducteur).

\* Schéma de la réaction



### 3.2.2.1- Les dosages utilisés

#### 3.2.2.1.1- La pH-métrie

L'acidification du milieu, due à la production de groupement carboxyliques libres (pectine-->acide pectique) provoquée par la PME, peut être quantifiée par titration à la soude (NaOH) 0.02N. Le pH mesuré doit être constamment ramené à sa valeur initiale (pH<sub>0</sub>) correspondant au pH optimal d'activité de l'enzyme (**Dhingra et al, 1974**). La réaction est suivie durant deux heures; la quantité totale de soude utilisée durant ce temps pour ramener (à intervalle régulier) le pH du milieu réactionnel constitue, une mesure de l'activité PME de la solution testée. Celle-ci est exprimée en ml de NaOH 0.02N ajouté/ml.h.

#### ■ Mélange réactionnel

— Dans un volume de 50ml, 7ml d'une solution de pectine à 0.1% dans du tampon Tris-HCl 0.02M, pH 8 (voir protocole en annexe 4), sont mélangés à 0.5ml de filtrat de culture. Le pH du mélange est ajusté à 8 avec du NaOH 0.05N, puis mis à incuber à 35°C. A intervalle régulier, la réaction est ajustée à pH 8 par titration avec NaOH 0.02N. Le témoin est représenté par une mixture du même mélange de réaction porté à ébullition.

- Lecture: une unité d'activité PME est définie comme la quantité d'enzyme demandant un milli-équivalent d'NaOH/h pour obtenir un pH=8.

#### 3.2.2.1.2- Mesure du pouvoir réducteur: mesure des activités hydrolases et trans-éliminases

la dépolymérisation de la pectine par les différentes enzymes entraînent une augmentation du pouvoir réducteur du milieu réactionnel. Cette caractéristique est mise à profit pour déterminer l'activité enzymatique par la méthode Somogyi-Nelson (**Nelson, 1944**), selon les recommandations de Marais (**Marais et al, 1966**).

#### ■ Mélange réactionnel des principales activités

##### - Mesure des Polygalacturonases (PG)

Le mélange réactionnel est constitué de 0.8ml d'une solution de polygalacturonate de sodium (sigma) à 0.1% tamponnée par la tampon acétate (pH 4.5-5 et 5.5) à 0.1M (procédure en annexe 4) et 0.2ml de filtrat de culture.

### - Mesure des Pectine-lyases (PL)

Même protocole que les PG. Dans ce cas le substrat c'est la pectine (unipectine). La solution est tamponnée par un tampon glycine NaOH (pH 9.5, 10 et 10.5) à 0.1M (procédure en annexe 4).

### - Mesure des endoglucanases ou cellulases (Cx)

Même protocole que précédemment. Le substrat dans ce cas est la carboxyl-méthyl-cellulose (CMC). La solution est tamponnée par un tampon acétate (pH 5 et 4.5) à 0.1M (procédure en annexe 4).

#### • Mode opératoire

Le mélange réactionnel est incubé entre 30mn et 1heure à 30°C. Après développement de la réaction enzymatique, celle-ci est stoppée par 0.5ml du réactif cuivrique ; l'ensemble est porté pendant 20mn dans un bain marie bouillant. Après refroidissement, 1ml du réactif arséno-molybdique est ajouté. les tubes sont agités pour dissoudre le mélange, le tout est transféré dans un volume de 50ml puis ajusté. Une coloration bleue se développe 1h 30 à 2 heures après. La lecture est faite à la longueur d'onde 750 nm avec un spectrophotomètre du type Shimatzu, UV. 120.01. Une courbe standard est réalisée avec le monomère correspondant: acide galacturonique (PG et PL) ou le glucose (Cx). Une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui produit une micro-mole de sucre en une heure à 30°C.

#### 3.2.2.1.3- Activité trans-éliminase (PL) et hydrolase (PG): méthode à l'acide thiobarbutirique (TBA) (Sherwood, 1966)

L'activité trans-éliminase est indiquée par la densité optique à 548 nm de la solution finale et l'activité hydrolase présente un pic à la densité optique de 515 nm.

Le milieu réactionnel est réalisé par le mélange de 0.4 ml d'une solution de substrat (pectine ou acide polygalacturonique) à 1% tamponnée et 0.1 ml de filtrat de culture. L'ensemble est incubé 1h30mn à 30°C. Le témoin est préparé avec l'extrait de culture chauffé pendant une heure dans l'eau.

Après développement de la réaction enzymatique, on ajoute au mélange réactionnel 2.5ml d'une solution de HCl 0.2M, puis 5ml d'une solution d'acide thiobarbutirique à 0.01M dans l'eau distillée. L'ensemble est porté une heure au bain marie bouillant, refroidi et réajusté au volume initial. Après filtration, les lectures de densité optique sont faites à 548nm pour les activités transéliminase (PL) et à 515nm pour les activités hydrolases (PG).

Une unité d'activité trans-éliminase ou hydrolase est définie comme la quantité d'enzyme qui produit (en 30 mn) et dans les conditions de l'expérience, une augmentation de 0.1 la densité optique.

### 3.3- Dosage des protéines

Afin de mesurer la quantité des protéines dans nos filtrats, la méthode de coloration au bleu de coomassie est utilisée selon la technique de **Bradford**, (1976). Cette technique est basée sur la faculté qu'à le bleu de coomassie (rouge en milieu acide) de se fixer sur les protéines et former un composé de couleur bleu. Le complexe ainsi formé, absorbe à 595nm et peut donc être dosé par spectrophotométrie. Une courbe étalon est réalisée à l'aide d'une solution de sérum albumine de boeuf (BSA) (de 0.05 à 1mg/ml). Le témoin est représenté par de l'eau distillée (Protocole en annexe 6).

## 4- Etudes électrophorétiques

### 4.1- Électrophorèse des protéines totales

#### 4.1.1- Principe

Toute molécule (acide aminé, peptide, protéine, acide nucléique, ....) chargée (ionisée) placée dans un champ électrique, migre sous l'effet du courant. Puisque les protéines sont des macromolécules amphotères présentant des charges électriques à tous les pH en dehors de leur point isoélectrique (PI), elles peuvent migrer. Les protéines chargées négativement migreront vers l'anode (-) et positivement vers la cathode (+). La vitesse de migration d'une molécule dépend du rapport entre la charge électrique et la masse de la protéine native (densité de charge). Plus la densité de charge est élevée plus rapide est la vitesse de migration.

Le gel de polyacrylamide peut-être considéré comme un système poreux où la taille des pores est du même ordre que celles des protéines. La séparation électrophorétique en conditions non dénaturantes s'effectue sous l'effet conjugué de la densité de charge et de la taille de ces molécules.

Les protéines, uniformément chargées négativement par le SDS, ne migrent plus que selon leur masse (poids moléculaire). Les plus petites se déplacent plus rapidement. On peut ainsi déterminer leur poids moléculaire à partir des protéines témoins de poids moléculaire connu, placées dans les mêmes conditions.

#### 4.1.2- Méthode analytique

La méthode utilisée est l'électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide de LAEMMLI, basée sur le système de tampon discontinu de ORNSTEIN et DAVIS (**Hames et Rickwood, 1987**). Cette méthode comporte deux gels superposés (un gel de concentration et un gel de résolution ou de

séparation), permet une bonne séparation et focalisation des bandes protéiques. L'appareil utilisé dans notre étude est la mini-cuve de chez Hoefer Scientific Instruments, dont les gels de résolution mesurent 7 sur 9cm.

#### **4.1.3- Préparation des échantillons**

Les filtrats de culture sont obtenus par le même procédé décrit dans le paragraphe (3.1.1.3). Dans ce cas, les échantillons sont concentrés au moins 30 fois de leur volume initial en subissant une dialyse supplémentaire à 4°C contre du PEG 20.000 (Fig 4). La concentration protéique des échantillons est estimée selon la méthode Bradford (1976). Cette concentration doit être comprise entre 0.3 et 0.4mg/ml. Les protéines sont analysées dans leur état naturel, elles sont appelées natives.

##### **4.1.4.1- En conditions natives**

80µl de filtrat protéique sont additionnés à 20µl d'une solution "marqueur" à base de glycérol à 50% et de bleu de bromophénol à 0.1% (voir procédure en annexe 7).

La solution est centrifugée à 12.000g à 4°C durant 20mn pour éliminer les restes du colorant. Durant la manipulation, les échantillons sont conservés au fond dans de la glace pilée.

#### **4.1.4- Composition des gels de polyacrylamide en plaque (condition native-PAGE)**

Le gel de séparation est à une concentration finale de 7.5% d'acrylamide, le gel de concentration à 4%. Le protocole est mentionné en annexe 8.

##### **4.1.5- Conditions de migration**

Le volume d'échantillon déposé par Puit est de 14µl. Le tampon de migration utilisé est le Tris-glycine pH 8.3 (procédure en annexe 8). L'électrophorèse est conduite sous un ampérage constant de 20 mAmpères pour deux gels. La température dans la cuve est maintenue à 5°C, grâce à un système de réfrigération.

##### **4.1.6- Système de révélation des protéines**

Les protéines sont colorées au bleu de Coomassie (annexe 10). Le gel est immergé, après électrophorèse dans la solution de fixation pendant 30mn, puis rincé 5mn dans la solution de décoloration. Le gel est mis à colorer pendant 1h30 à 2h sur agitateur rotatif, puis décoloré par trempages successifs dans 3 à 4 bains de la solution de décoloration avec un changement de bain toutes les 1 à 2h. Le gel est immergé dans

la solution de conservation pendant une nuit, puis séchée à l'air entre deux feuilles de cellophane préalablement imbibées de solution de conservation (annexe 10).

## **4.2- Révélation des estérases**

Les estérases constituent un groupe d'enzymes capables d'hydrolyser les esters. En général trois groupes d'estérases sont décrites chez les organismes vivants: les aliestérases agissant sur les esters aliphatiques et les cholinestérases qui scindent des esters d'acétylcholine.

Dans notre cas, seules les aliestérases, sont détectées selon la méthode utilisée. Le protocole de révélation est présenté en annexe 11.

Cette technique intéresse uniquement le système PAGE (en condition native) où les activités biologiques sont préservées. Le protocole retenu est celui de Siciliano et Show (1976), modifié par Some (1988) (Voir 4.1).

— Pour l'analyse des profils, chaque protéine peut être caractérisée par son Rf (rapport entre la distance de migration de la protéine sur celle du front de migration : bleu de Bromophénol).

## **4.3- Isoélectrofocalisation et révélation d'activités dépolymérisantes**

### **4.3.1- Principe**

L'isoélectrofocalisation est effectuée sur gel de polyacrylamide en plaque ultra mince contenant une solution d'ampholytes, qui, sous l'action du champ électrique, établissent un gradient de pH dans le gel, de l'anode à la cathode, ce qui permet de focaliser les enzymes selon leur point isoélectrique. Elle permet d'étudier la variabilité entre les souches au niveau des isoenzymes.

### **4.3.2- Préparation des échantillons**

Les filtrats de culture concentrés par dialyse sont utilisés au même titre que pour les profils de protéine totale (voir paragraphe 4.1.3).

### **4.3.3- Composition du gel de polyacrylamide**

Le gel de polyacrylamide (PAA) est à 10% d'acrylamide (Davis, 1964; Ornstein, 1964) en plaque ultramince de 0.5mm contenant 10% d'ampholytes porteurs pharmacia (pH 3-10) (Bertheau et al, 1984) (protocole mentionné en annexe 12).

#### 4.3.4- Mise en place des échantillons et migration

Dix microlitres de filtrats sont déposés coté acide du gel sur des rectangles de papier Whatman 3MM (5x10 mm) pour la révélation des pectinases et du micro fibre de glace GF/A pour la révélation des cellulases. Le témoin est représenté par une solution de pectinase à 0.1mg/ml d'*Aspergillus niger*. La migration est faite sur un support LKB (multi phor 2117) à 30w durant une heure (générateur de courant LKB2197). L'anode est une mèche de papier LKB imbibée d'acide sulfurique 0.1N; et la cathode de même nature, est imbibée de soude 0.1N (Bertheau et al, 1984).

#### 4.3.5- Mise en évidence des activités enzymatiques

Cette détection est réalisée en appliquant le gel de polyacrylamide sur un gel d'agar noble à 1.5% contenant le substrat de l'enzyme étudiée à 0.5% dans un tampon approprié:

- La carboxyméthyl-cellulose dans un tampon Tris-maléate 0.1M pH 5 (annexe 13) pour les cellulase ou endoglucanase (CMC).

- La pectine ruban brun dans un tampon citrate phosphate 0.05M pH 6.5 (annexe 13) pour les pectines méthyle estérase (PME).

- L'acide polygalacturonique dans le tampon citrate NaOH (citrate II Sorensen) à 0.1M pH 5 pour les pectate-hydrolases (PGH) (Bertheau et al, 1984).

Auparavant, les gels de PAA subissent une préincubation dans un tampon identique à celui du gel d'agar (10mn).

Les incubations durent 3 à 4h à 30°C. Les activités endoglucanases (CMC) sont révélées en colorant la CMC non dégradée du gel d'agar en rouge congo à 1% (Wood, 1981) et rincées dans plusieurs bains d'NaCl 1M; les Polygalacturonases sont révélées en précipitant l'acide polygalacturonique résiduel au bromure de cethyl-triméthylammonium à 1% (Bertheau et al, 1984).

Les Pectines méthyl-estérases (PME) sont révélées après un bain d'acide malique 0.1 M d'une durée d'une heure, puis dans une solution de rouge de Ruthénium à 0.02%. Les gels sont mis dans les différents révélateurs sous agitation jusqu'à apparition des activités (1 heure à une nuit) (Bertheau et al, 1984).

Les activités enzymatiques apparaissent en blanc sur fond rouge pour les endoglucanases; en translucide sur fond blanc pour les PGH et rouge ou orange sur rose très clair pour les PME. Les activités apparaissent sur les deux gels PAA et gel d'agar noble (Bertheau et al, 1984).

## *CHAPITRE III*

### *Résultats et discussions*

## 1-Evaluation du pouvoir pathogène des isolats *d'Ascochyta rabiei*

L'étude de l'agressivité des isolats est nécessaire afin de vérifier la corrélation qui pourrait exister entre le pouvoir pathogène et la capacité à produire des enzymes dépolymérisantes, métabolites jouant un rôle probable dans la pathogénèse.

La réaction de chaque génotype à chacun des isolats est caractérisée par une note moyenne sur 5 plantes. Une seule notation est faite, 15 jours après inoculation (Tableau 7).

Les résultats obtenus nous ont permis de classer les isolats en fonction de leur agressivité. L'analyse de la variance met en évidence des différences significatives entre les isolats et permet de les classer en groupes selon leur degré d'agressivité en ordre décroissant (Tableau 8) :

- un groupe d'agressivité très élevée: isolat 89.07 et isolat 90.03,
- un groupe d'agressivité intermédiaire mais qui reste assez importante: isolat Tess, isolat To, isolat Hatt et isolat Tia,
- un groupe d'agressivité relativement faible: isolat At et isolat Sig.

**Tableau 7:** Niveau d'agressivité des isolats sur 5 cultivars 15 jours après leur inoculation par 8 isolats *d'Ascochyta rabiei* [C]:  $10^6$  s/ml

Isolats Lignées	Tess	Sig	To	AT	Hatt	89.07	Tia	9003
Ilc200	5.6 *	4.5	4.8	4.3	5	7.3	5.3	9
Ilc182	5	4	6.3	4.3	5.4	7	5	7
Ilc1929	9	9	9	9	9	9	9	9
Icc3996	7	2	6.8	5	6.8	8	5	7
Icc4107	7.3	5.3	6.1	4.5	6.8	9	7	7

\* = note moyenne exprimée sur 5 plantes sur une échelle de 1 à 9 (Reddy et Singh, 1984).

**Tableau 8:** Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour le pouvoir pathogène

**Analyse de variance**

Origine de fluct.	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	131.08	39	3.36				
Facteur 1	38.94	7	5.56	5.79	0.0003		
Facteur 2	65.21	4	16.30	16.95	0.0000		
Résiduelle	26.93	28	0.96				
						0.98	14.9%

**Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%**

**Facteur 1 :Isolats**

Nombre de moyennes	2	3	4	5	6	7	8
Valeurs des ppas	1.27	1.53	1.69	1.81	1.90	1.97	2.03

F1	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes	
6	89.00	8.06	A	
7	90.03	7.80	A	
1	Tess	6.78	A	B
3	To	6.60	A	B
5	Hatt	6.60	A	B
8	Tia	6.26	A	B
4	AT	5.42		B
2	Sig	4.96		B

## 2- Evaluation *in vitro* des activités enzymatiques

Une étude sur les isolats d'*Ascochyta rabiei* (Tchicha, 1991) a mis en évidence des activités enzymatiques dans le milieu de culture liquide. Ces enzymes sont du groupe des Pectine Méthylestérases (PME), Polygacturonases (PG) et cellulases (Cx) et leur sécrétion semble en corrélation positive avec le niveau d'agressivité des isolats. Seulement, les techniques utilisées telles que « Cup plate » (diffusion sur milieu gélosé) ou viscosimétrie (mesure de la diminution de la viscosité d'un mélange dans le temps) sont peu précises, plutôt de type qualitatif.

Notre choix de techniques de dosage des activités enzymatiques telles que la colorimétrie, a été guidé par le fait que cette dernière donnait des résultats chiffrés faciles à analyser.

Dans cette première partie des résultats de l'étude *in vitro*, sont présentés:

1. les systèmes enzymatiques sécrétés dans le milieu par *Ascochyta rabiei* mis en évidence par une technique rapide (APIZYM). Ces sécrétions seront appréciées selon l'agressivité des isolats,
2. l'influence des sources de carbone sur les activités enzymatiques ayant un rôle direct dans la pathogénèse, notamment, les pectinases et les cellulases,
3. la variation des activités enzymatiques de 8 isolats sur le milieu Mathur - Pectine.

### 2.1- Révélation des enzymes extracellulaires par le système APIZYM

Deux isolats d'*Ascochyta rabiei*: Tessala, agressif et Sig faiblement agressif, ont été testés dans ce cas là à partir du diffusât liquide de Pois chiche (DPC), après 9 jours d'incubation. Ce test permet de mettre en évidence les systèmes enzymatiques présents dans le filtrat de culture, et pouvant avoir un rôle dans la pathogénèse (Tableau 9).

Ainsi des groupes d'enzymes ont été mis en évidence telles que les estérases, qui peuvent être des enzymes dépolymérisantes de la paroi cellulaire des plantes ou d'autres constituants cellulaires. Les galactosidases, les glucosidases et les mannosidases, peuvent intervenir également sur les constituants cellulaires et sont probablement d'origine constitutive.

Cette technique n'a pas été largement exploitée en testant, par exemple, différents milieux et différentes périodes d'incubation, ou dans des conditions *in vivo* et cela par manque de moyens. Il reste que les résultats obtenus sont révélateurs d'activités enzymatiques intéressantes existant dans un filtrat de culture. La comparaison de nos résultats avec les travaux de Bouznad (1978) sur *Ascochyta pisi*, cultivé sur milieu pois, montre que certaines enzymes révélées, sont communes aux champignons, telles que les phosphatases alcalines et acides, alors que les chymotrypsines et les glucosaminidases ne sont pas détectées chez *A. pisi*.

**Tableau 9:** Principales activités enzymatiques révélées par le système API-ZYM pour les isolats d'*Ascochyta rabiei* (Tessala et Sig sur filtrat du milieu diffusât de Pois chiche (période d'incubation 9 jours). \* Voir 3.2.1.3

Enzyme recherchée	Tessala	Sig
Témoin	0	0
Phosphatase alcaline	5 *	5
Estérase (C4)	2	2
Estérase Lipase (C8)	3	3
Lipase (C14)	1	1
Leucine arylamidase	5	5
Valine arylamidase	2	3
Cystine arylamidase	2	1
Trypsine	3	2
$\alpha$ Chymotrypsine	1	1
Phosphatase acide	4	4
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	5	5
$\alpha$ Galactosidase	2	1
$\beta$ Galactosidase	4	4
$\beta$ Glucuronidase	0	0
$\alpha$ Glucosidase	5	5
$\beta$ Glucosidase	5	4
N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase	5	3
$\alpha$ Mannosidase	0	1
$\alpha$ Fucosidase	0	0

## 2.2.- Variabilité biochimique d'*Ascochyta rabiei*

### 2.2.1- Influence du milieu : comparaison de l'effet de trois milieux liquides: Mathur-Pectine (MP), Mathur (M) et Diffusât de Pois chiche (DPC)

Les trois milieux sont testés pour évaluer les activités enzymatiques à l'égard de trois sources de carbone: la Pectine à 5% est substituée au glucose dans le milieu Mathur, le glucose constituant du milieu Mathur et le milieu à base de Pois chiche se rapprochant de l'hôte naturel du champignon: Ces composés nous ont permis d'étudier l'influence du milieu de culture sur la variabilité physico-chimique des deux isolats Tessala et Sig, au niveau de l'évolution du pH, de la croissance mycélienne, des protéines totales et des activités enzymatiques.

### 2.2.1.1- Evolution du pH

Le développement d'un champignon sur un milieu, entraîne la variation du pH qui serait due à la sécrétion de métabolites, au cours de la croissance mycélienne.

Pour les milieux Mathur Pectine et Mathur, cette évolution se fait d'un pH acide vers un pH neutre. Ainsi, durant la croissance des 2 isolats, le milieu Mathur passe de 5.5 à environ 7 et de 5.0 à 7.2 pour le milieu Mathur-Pectine. Cette variation est plus élevée sur milieu Mathur-Pectine. Sur milieu DPC, la variation se fait du pH 7.3 au pH basique 8.89 pour Tessala, et au pH 8.76 pour Sig (Tableau 10).

L'analyse des variances met en évidence des différences hautement significatives entre milieux et des différences non significatives entre les isolats (Tableau 11).

Le classement établi d'après le test de Newman-Keuls, donne deux groupes homogènes pour les milieux sur la base des moyennes des pH. Le milieu Mathur et Mathur-Pectine forment un seul groupe, puisque leur pH initial est du même ordre de grandeur (Tableau 11).

**Tableau 10:** Evolution du pH en fonction du temps dans 3 milieux de culture des isolats Tessala et Sig (Moyenne de 3 essais).

#### Milieu Mathur-Pectine

Période d'incubation	0h	24h	48h	3j	6j	9j
Tessala	5.0	4.86	5.93	6.45	7.00	7.21
Sig	5.0	5.02	4.95	6.40	6.85	7.2

#### Milieu Mathur

Période d'incubation	0h	24h	48h	3j	6j	9j
Tessala	5.5	5.63	5.93	6.53	6.42	6.9
Sig	5.5	5.6	5.2	5.87	6.83	6.8

#### Milieu diffusât de Pois chiche

Période d'incubation	0h	24h	48h	3j	6j	9j
Tessala	7.3	7.36	7.23	7.43	8.92	8.89
Sig	7.3	7.36	7.26	7.42	8.63	8.76

**Tableau 11:** Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour la variation du pH dans les trois milieux

**Analyse de variance**

Origine de fluct.	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	46.12	35	1.32				
Facteur 1	25.17	2	12.88	238.17	0.0000		
Facteur 2	17.44	5	3.49	64.47	0.0000		
Facteur 3	0.17	1	0.17	3.06	0.1081		
Inter F1.F2	1.80	10	0.18	3.32	0.0362		
Inter F1.F3	0.02	2	0.01	0.20	0.8249		
Inter F2F3	0.40	5	0.08	1.47	0.2817		
Résiduelle	0.54	10	0.05				
						0.23	3.5%

Facteur1 = Milieu

Facteur2 = Temps d'incubation

Facteur3 = Isolat

**Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%**

**Facteur 1 :Milieu**

Nombre de moyennes                    2                    3  
 Valeurs des ppas                        0.21                0.26

F1	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes	
3	DPC	7.82	A	
1	Mathur	6.07		B
2	M.Pectine	5.99		B

### 2.2.1.2- Evolution du poids pondéral

Le poids pondéral augmente au cours des périodes d'incubation avec un maximum après 6 jours d'incubation pour les deux isolats sur milieu Mathur-Pectine.

Sur milieu Mathur, l'isolat Sig atteint un taux maximum également au bout de 6 jours d'incubation, alors que Tessala après 3 jours seulement. Sur milieu Pois chiche, les deux isolats atteignent un maximum après le troisième jour de culture.

Le milieu à base de Pectine paraît le plus favorable à la croissance mycélienne suivi par le milieu glucose (Tableau 12).

L'analyse de la variance met en évidence des différences très significatives entre les trois milieux et entre les isolats et des différences non significatives entre les périodes d'incubation. Le classement établi par le test de Newman-Keuls au seuil 5%, classe en groupes homogènes les milieux et les périodes d'incubation (Tableau 13).

**Tableau 12:** Evolution du poids pondéral en mg/ml de milieu pour les isolats d'*Ascochyta rabiei* (Tessala et Sig) cultivés dans trois milieux liquides (moyenne de trois essais).

#### Milieu Mathur-Pectine

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j
Tessala	0.695	1.430	2.030	5.570	3.420
Sig	0.680	1.470	2.510	5.410	3.380

#### Milieu Mathur

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j
Tessala	0.120	1.380	2.02	1.480	1.510
Sig	0.150	1.300	1.520	1.900	1.720

#### Milieu diffusât de Pois chiche

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j
Tessala	0.240	0.620	0.760	0.680	0.680
Sig	0.320	0.668	0.900	0.840	0.620

**Tableau 13:** Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour la variation du poids pondéral dans les trois milieux

**Analyse de variance**

Origine de fluctuation	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	53.84	29	1.86				
Facteur 1	21.29	2	10.65	238.24	0.0000		
Facteur 2	0.02	1	0.02	0.42	0.5391		
Facteur 3	17.30	4	4.33	96.81	0.0000		
Inter F1.F2	0.00	2	0.00	0.05	0.9504		
Inter F1.F3	14.84	8	1.86	41.53	0.0000		
Inter F2F3	0.02	4	0.00	0.09	0.9795		
Résiduelle	0.36	8	0.04				
						0.21	13.8%

Facteur1 = Milieu

Facteur2 = Temps d'incubation

Facteur3 = Isolat

**Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%**

**Facteur 1 :Milieu**

Nombre de moyennes

2 3

Valeurs des ppas

0.22 0.27

F1	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes		
1	M.Pectine	2.66	A		
2	Mathur	1.31		B	
3	DPC	0.63			C

### 2.2.1.3- Evolution des concentrations des protéines totales extracellulaires

La concentration des protéines totales dans les filtrats de culture pour les deux isolats est maximale après 24 heures d'incubation sur milieu Pectine, puis baisse légèrement au sixième et neuvième jour. Sur les milieux Mathur et Pois chiche, les concentrations augmentent au cours du temps. Le milieu Pectine favorise la sécrétion des protéines pendant toute la période d'incubation, alors que les autres milieux permettent une production progressive.

Sur les trois filtrats, l'isolat Tessala paraît plus productif que l'isolat Sig (Tableau 14).

L'analyse de la variance met en évidence des différences significatives entre les deux isolats et entre milieux. Des différences hautement significatives sont notées entre les périodes d'incubation (Tableau 15).

Le test de Newman-Keuls classe les isolats dans deux groupes homogènes:

- Isolat très productif (Tess.)
- Isolat faiblement productif (Sig)

Les milieux forment aussi deux groupes:

- Milieu Pectine (MP): très favorable
- Milieu (M et DPC) : moins favorable

**Tableau 14:** Concentration des protéines totales exprimées en mg/ml des isolats d'*Ascochyta rabiei* (Tessala et Sig) sur filtrat des trois milieux. Méthode d'analyse selon **Bradford (1976)**.

#### Milieu Mathur-Pectine

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j
Tessala	0.032	0.035	0.030	0.020	0.024
Sig	0.031	0.009	0.030	0.024	0.025

#### Milieu Mathur

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j
Tessala	0.006	0.012	0.015	0.019	0.060
Sig	0.003	0.010	0.010	0.008	0.048

#### Milieu diffusât de Pois chiche

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j
Tessala	0.021	0.021	0.018	0.015	0.040
Sig	0.008	0.012	0.015	0.010	0.028

**Tableau 15:** Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour l'évolution des concentrations des protéines totales dans les trois milieux

**Analyse de variance**

Origine de fluctuation	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	0.01	29	0.00				
Facteur 1	0.00	2	0.00	5.74	0.0284		
Facteur 2	0.00	1	0.00	7.76	0.0231		
Facteur 3	0.00	4	0.00	15.84	0.0009		
Inter F1.F2	0.00	2	0.00	0.12	0.8871		
Inter F1.F3	0.00	8	0.00	7.16	0.0064		
Inter F2F3	0.00	4	0.00	0.78	0.5711		
Résiduelle	0.00	8	0.00				
						0.01	27.5%

Facteur1 = Milieu

Facteur2 = Temps d'incubation

Facteur3 = Isolat

**Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%**

**Facteur 1 :Milieu**

Nombre de moyennes                    2            3  
 Valeurs des ppas                        0.01       0.01

F1	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes	
1	M.Pectin	0.03	A	
2	Mathur	0.02		B
3	DPC	0.02		B

**Facteur 1 :Isolat**

Nombre de moyennes                    2  
 Valeurs des ppas                        0.001

F1	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes	
1	Tess	0.020	A	
2	Sig	0.021		B

#### 2.2.1.4- Activité des polygalacturonases (PG)

Les activités ont été recherchées sur une gamme de pH (4.5; 5 et 5.5), intervalle comprenant l'optimum des activités des PG des champignons.

L'activité des PG présente un optimum au pH 5 sur les trois milieux et paraît être favorisée par le milieu Pectine (MP) pour les deux isolats d'*Ascochyta rabiei*.

Sur filtrats MP, l'activité des PG au pH 4.5 est faiblement décelée, et sur les deux autres milieux M et DPC, cette activité étant trop faible, n'est plus détectée.

L'isolat Tess. est très actif en PG après 24 heures d'incubation sur filtrat MP. Cette activité augmente progressivement jusqu'au sixième jour et chute au neuvième jour de 50%. Sur milieu M, les PG sont actives dès 24 heures de culture, avec un maximum après 48 heures. Sur milieu DPC, ces enzymes sont aussi actives après 24 heures et atteignent un maximum après 3 jours (Tableau 16).

L'isolat Sig présente une activité PG dès 24 heures de culture sur filtrat de Pectine (MP), celle-ci augmente au bout de 48 heures de culture et reste constante. Sur milieu Mathur, l'isolat Sig semble moins actif sauf pour le premier jour avec 100 Unités (U) contre 66U sur MP. Sur milieu DPC, l'activité est beaucoup moins élevée (Tableau 17).

L'analyse des variances montre des différences hautement significatives entre les milieux et des différences non significatives entre les périodes d'incubation pour les deux isolats (Tableau 18-19).

Le test de Newman-Keuls classe les milieux en groupes homogènes.

L'isolat Tessala présente des niveaux d'activité de PG faibles sur les milieux M et DPC par rapport à ceux de l'isolat Sig sur les mêmes milieux.

**Tableau 16:** Optimum des pH d'activité des polygalacturonases (PG) de l'isolat d'*Ascochyta rabiei* (Tess) dans trois filtrats de culture

**Milieu Mathur-Pectine**

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j	
pH 4	-	-	-	-	-	
pH 4.5	0.008	0.094	0.084	0.008	0.01	a
	7.50	88.7	79.2	7.5	9.4	b
pH 5	0.230	0.260	0.305	0.305	0.110	a
	217	245	287.7	287.7	103.8	b

**Milieu Mathur**

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j	
pH 4	-	-	-	-	-	
pH 4.5	-	-	-	-	-	
pH 5	0.019	0.096	0.046	0.056	0.086	a
	17.9	90.6	43	52.8	81	b

**Milieu diffusât de Pois chiche**

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j	
pH 4	-	-	-	-	-	
pH 4.5	-	-	-	-	-	
pH 5	0.004	0.016	0.026	0.014	0.010	a
	3.8	15	24.5	13.6	9.4	b

a- Concentration des sucres (acide galacturonique) en mg/ml.

b- Activité enzymatique exprimée en Unités/ml de filtrat/hx10<sup>4</sup>.

- Temps d'incubation (30 mn).

(-) aucune activité.

**Tableau 17:** Optimum des pH d'activité des polygalacturonases (PG) de l'isolat *d'Ascochyta rabiei* (Sig) dans trois filtrats de culture.

**Milieu Mathur-Pectine**

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j	
pH 4	-	-	-	-	-	
pH 4.5	0.030 28	0.030 28	0.066 62	0.066 62	0.086 81	a b
pH 5	0.07 66	0.305 287	0.302 284.9	0.305 287	0.302 284.9	a b

**Milieu Mathur**

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j	
pH 4	-	-	-	-	-	
pH 4.5	-	-	-	-	-	
pH 5	0.106 100	0.160 150.9	0.144 135	0.296 279	0.224 211	a b

**Milieu diffusât de Pois chiche**

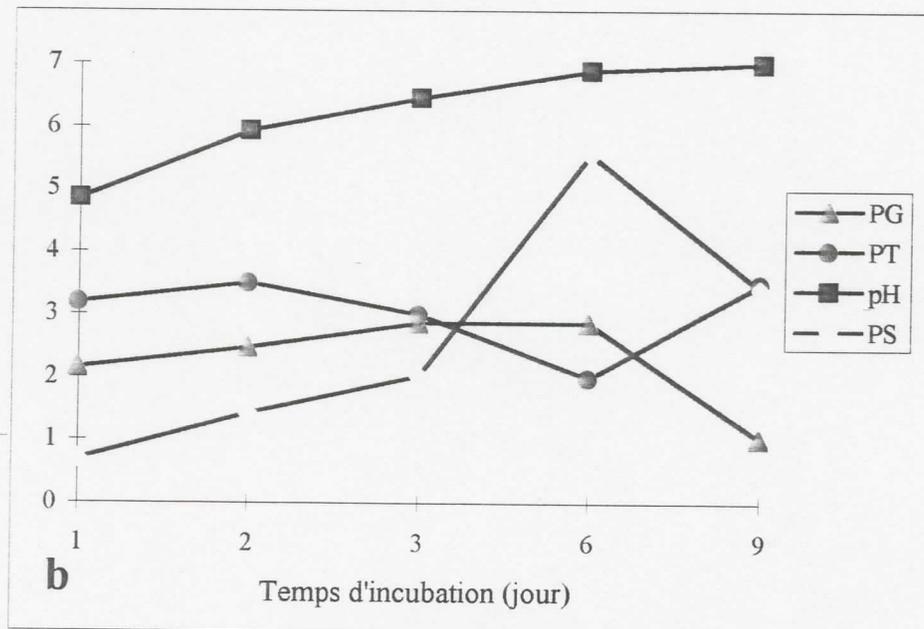
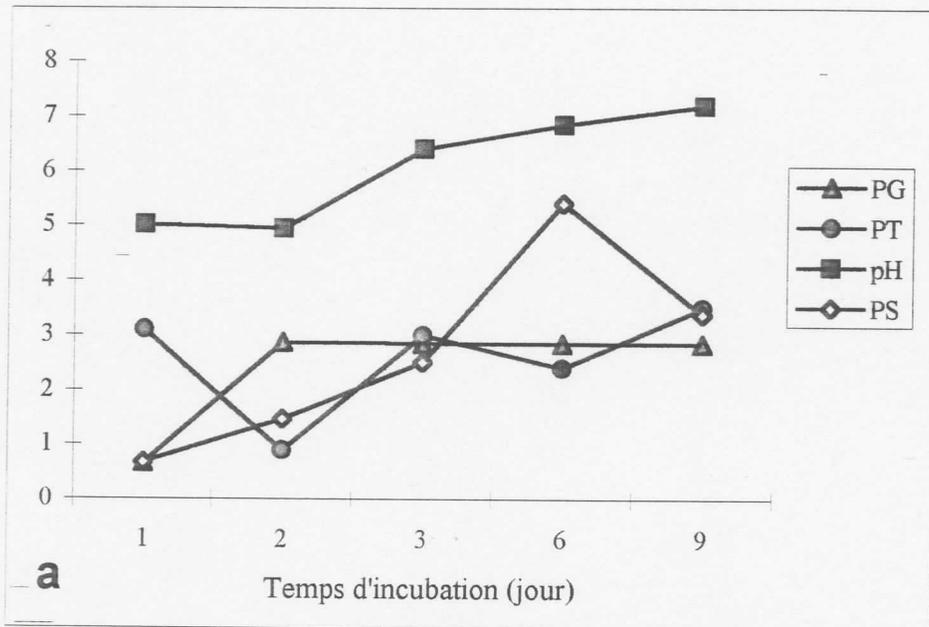
Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j	
pH 4	-	-	-	-	-	
pH 4.5	-	-	-	-	-	
pH 5	0.028 26.4	0.028 26.4	0.001 0.95	0.036 34	0.048 45	a b

a- Concentration des sucres (acide galacturonique) en mg/ml.

b- Activité enzymatique exprimée en Unités/ml de filtrat/hx10<sup>4</sup>.

- Temps d'incubation (30 mn)

(-) aucune activité.



**Fig 5-** Activité des PG pour les deux isolats Sig (a) et Tessala (b) sur milieu Pectine 0.5% (PT : protéine totale, PS : poids sec)

**Tableau 18:** Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour l'évolution des activités PG dans les trois milieux pour l'isolat Sig

**Analyse de variance**

Origine de fluctuation	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	186188.28	14	13299.16				
Facteur 1	126221.08	2	63110.54	21.00	0.0008		
Facteur 2	35920.09	4	8980.02	2.99	0.0877		
Résiduelle	24047.11	8	3005.89				
						54.83	37.4%

Facteur 1 = Milieu

Facteur 2 = Temps d'incubation

**Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%**

**Facteur 1 :Milieu**

Nombre de moyennes                    2                    3  
 Valeurs des ppas                        80.04            98.98

F1	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes	
1	M.Pectine	241.96	A	
2	Mathur	175.18	A	
3	DPC	22.77		B

**Tableau 19:** Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour l'évolution des activités PG dans les trois milieux pour l'isolat Tessala

**Analyse de variance**

Origine de fluctuation	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	155707.17	14	11121.94				
Facteur 1	7825.03	4	1956.264	0.830	0.5425		
Facteur 2	129062.38	2	64531.19	27.43	0.0004		
Résiduelle	18819.77	8	2352.47				
						48.50	48.7%

**Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%**

**Facteur 2 :Milieu**

Nombre de moyennes            2            3  
Valeurs des ppas            70.81       87.56

F2	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes	
1	M.Pectine	228.24	A	
2	Mathur	57.06		B
3	DPC	13.26		B

**2.2.1.5- Activité des pectines lyases (PL)**

Les PL sont sécrétées par les deux isolats dans les 3 milieux de culture. En présence de Pectine à 0.5%, la sécrétion est au plus haut niveau au deuxième jour pour Sig et au troisième jour pour Tessala. Les activités sont décelées sur toute la période d'incubation.

Le milieu glucose permet également la sécrétion des (PL) avec des taux élevés dès le premier jour pour l'isolat Sig, et à partir du deuxième jour pour l'isolat Tessala.

Les optimums d'activités pour les (PL) sur les trois milieux se situent à pH 10.5; elles sont faibles ou nulles pour les pH 10 et 11 (Tableau 20-21).

L'analyse statistique met en évidence des différences hautement significatives entre les milieux pour l'isolat Tessala, et des différences seulement significatives pour l'isolat Sig.

Le test de Newman-Keuls permet de classer les milieux en trois groupes homogènes pour Sig et en deux groupes pour Tessala (Tableau 22,23).

**Tableau 20:** Optimum des pH d'activité des Pectines Lyases (PL) de l'isolat d'*Ascochyta rabiei* (Sig) dans trois filtrats de culture.

**Milieu Mathur-Pectine**

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j
pH 10	-	-	-	-	-
pH 10.5	0.175 164	0.260 245	0.144 135	0.086 081	0.086 081    a b
pH 11	-	0.056 053	-	-	-

\* Temps d'incubation du mélange réactionnel est de 30'.

### Milieu Mathur

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j
pH 10	-	-	-	-	-
pH 10.5	0.118 111	0.0029 2.7	- -	- -	a b
pH 11	- -	- -	- -	- -	- a - b

\*Temps d'incubation du milieu réactionnel est de 30 mn.

### Milieu diffusât de Pois chiche

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j	
pH 10	-	-	-	-	-	
pH 10.5	0.036 034	0.045 045	0.080 075	0.084 075	0.125 117	a b
pH 11	0.036 034	-	0.026 024	0.016 015	0.066 062	a b

a- Concentration des sucres (acide galacturonique) en mg/ml.

b- Activité enzymatique exprimée en Unités/ml de filtrat/hx10<sup>4</sup>.

\* Temps d'incubation est de 30 mn.

(-) aucune activité.

**Tableau 21:** Optimum des pH d'activité des Pectines Lyases (PL) de l'isolat *d'Ascochyta rabiei* (Tessala) dans trois filtrats de culture.

### Milieu Mathur-Pectine

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j	
pH 10	-	-	-	-	-	
pH 10.5	0.260 245	0.286 270	0.290 273	0.158 149	0.158 149	a b
pH 11	0.137 129	0.260 245	-	-	-	

### Milieu Mathur

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j
pH 10	-	-	-	-	-
pH 10.5	-	0.098 092	- -	- -	a b
pH 11	- -	0.010 09.4	- -	- -	- a - b

### Milieu diffusât de Pois chiche

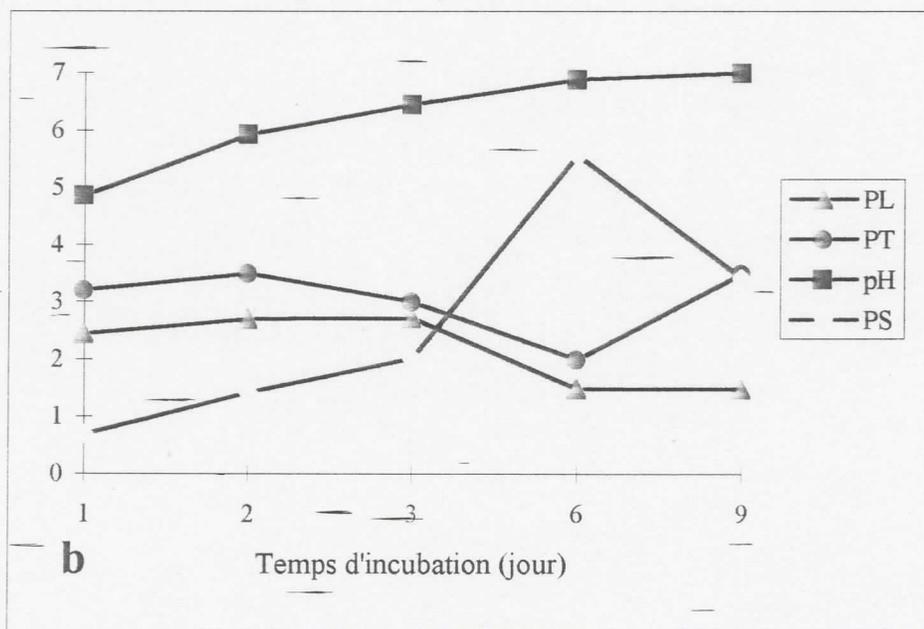
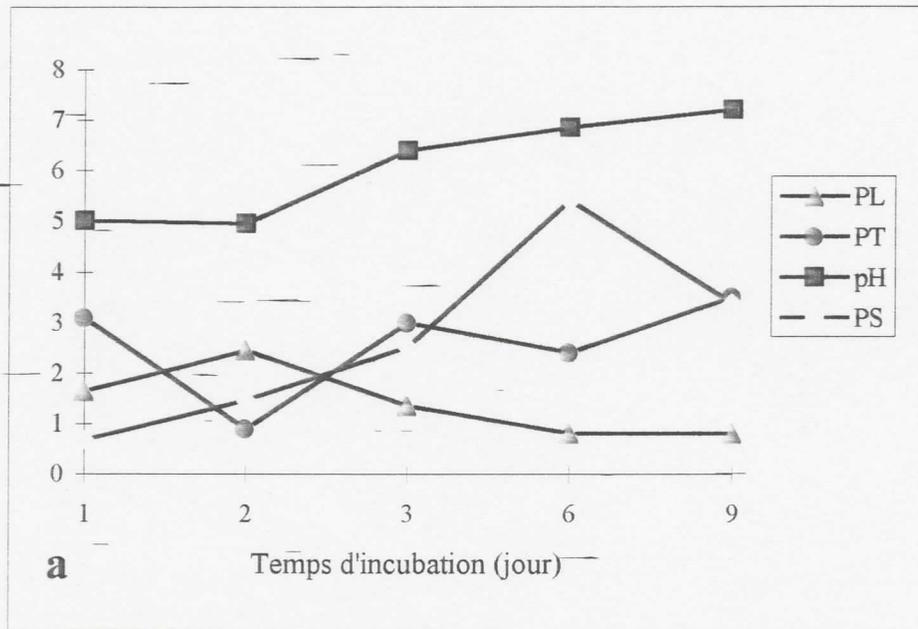
Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j
pH 10	-	-	-	-	-
pH 10.5	0.043 040	0.068 064	0.050 048	0.048 045	0.050 048 a b
pH 11	-	-	-	-	-

a- Concentration des sucres (acide galacturique) en mg/ml.

b- Activité enzymatique exprimée en Unités/ml de filtrat/hx10<sup>4</sup>.

- Temps d'incubation (30 mn)

(-) aucune activité.



**Fig 6.** Activité des PL pour les deux isolats Sig (a) et Tessala (b) sur milieu Pectine 0.5% (PT : protéine totale, PS : poids sec)

**Tableau 22:** Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour la variation des activités PL dans les trois milieux pour l'isolat Sig

**Analyse de variance**

Origine de fluctuation	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	68117.93	14	4865.57				
Facteur 1	35575.59	2	17787.79	5.27	0.0346		
Facteur 2	5522.44	4	1380.61	0.41	0.7988		
Résiduelle	27019.90	8	3377.49				
						58.12	74.6%

Facteur 1 = Milieu

Facteur 2 = Temps d'incubation

**Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%**

**Facteur 1 :Milieu**

Nombre de moyennes	2	3
Valeurs des ppas	84.84	104.92

F1	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes	
1	M.Pectine	141.20	A	
2	DPC	69.808	A	B
3	Mathur	22.74		B

**Tableau 23:** Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour l'évolution des activités PL dans les trois milieux pour l'isolat Tessala

**Analyse de variance**

Origine de fluctuation	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	137653.67	14	9832.41				
Facteur 1	114581.69	4	75290.84	42.95	0.0001		
Facteur 2	12400.418	2	3100.10	2.32	0.1439		
Résiduelle	10671.58	8	1333.95				
						36.52	38.5%

## Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%

### Facteur 1 :Milieu

Nombre de moyennes	2	3
Valeurs des ppas	53.32	65.94

F1	Libellés	Moyennes	Groupes	homogènes
1	M.Pectine	217.20	A	
2	DPC	49.00		B
3	Mathur	18.40		B

#### **2.2.1.6- Activité des Pectine-méthylestérases (PME)**

L'activité des PME apparaît être favorisée par le milieu MP, suivi par le milieu DPC. Pour les deux isolats Tessala et Sig, la production de PME est maximum après 24 heures d'incubation. Cette activité diminue progressivement durant la période d'incubation et parfois s'annule sur milieu M, PC et MP pour l'isolat Sig au troisième, neuvième et dixième jour respectivement. Pour l'isolat Tessalan cette activité s'annule au sixième jour sur milieu PC et M (Tableau 24).

L'isolat Tessala semble plus productif surtout sur milieu Pectine et Pois chiche.

L'analyse de la variance met en évidence des différences hautement significatives entre les milieux et les périodes d'incubation et des différences significatives entre les isolats (Tableau 25).

Le test de Newman-Keuls classe en groupes homogènes les milieux et les périodes d'incubation. Les isolats sont classés en deux groupes (Tableau 25).

**Tableau 24:** Activité des pectines methylestérases (PME) des 2 isolats d'*Ascochyta rabiei* (Tessala+Sig).

Dosage par titration. 1 unité d'activité PME est définie comme la quantité d'enzymes demandant un milliéquivalent d'NaOH/heure/ml de filtrat d'enzyme.

**Milieu Mathur-Pectine**

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j
Tessala	5.0	3.6	2.8	0.4	0.2
Sig	4.0	3.0	1.0	0.4	0.0

**Milieu Mathur**

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j
Tessala	0.8	0.4	0.2	0.0	0.0
Sig	0.8	0.4	0.0	0.0	0.0

**Milieu diffusât se Pois chiche**

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j
Tessala	2.0	1.8	0.4	0.0	0.0
Sig	1.8	1.4	0.3	0.0	0.0

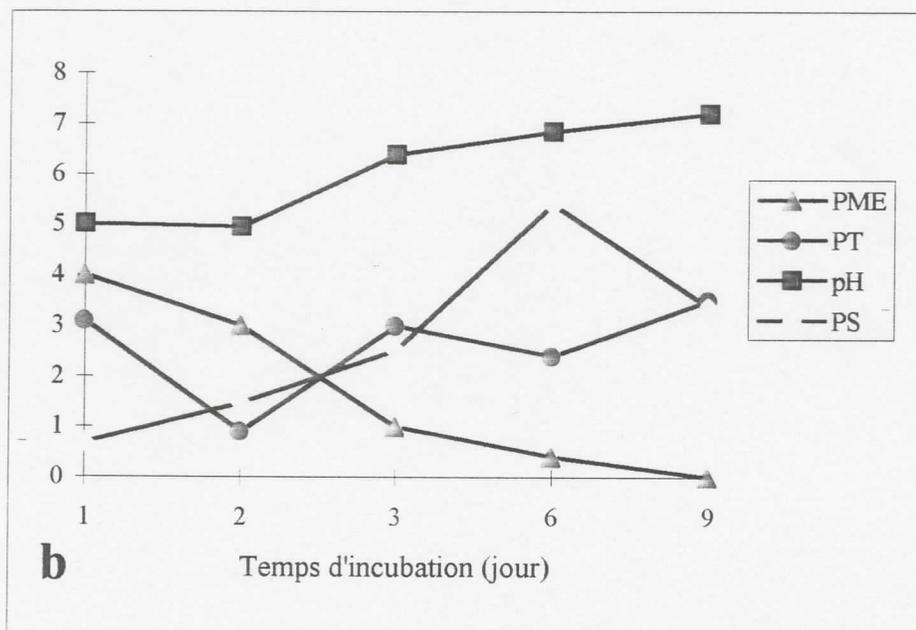
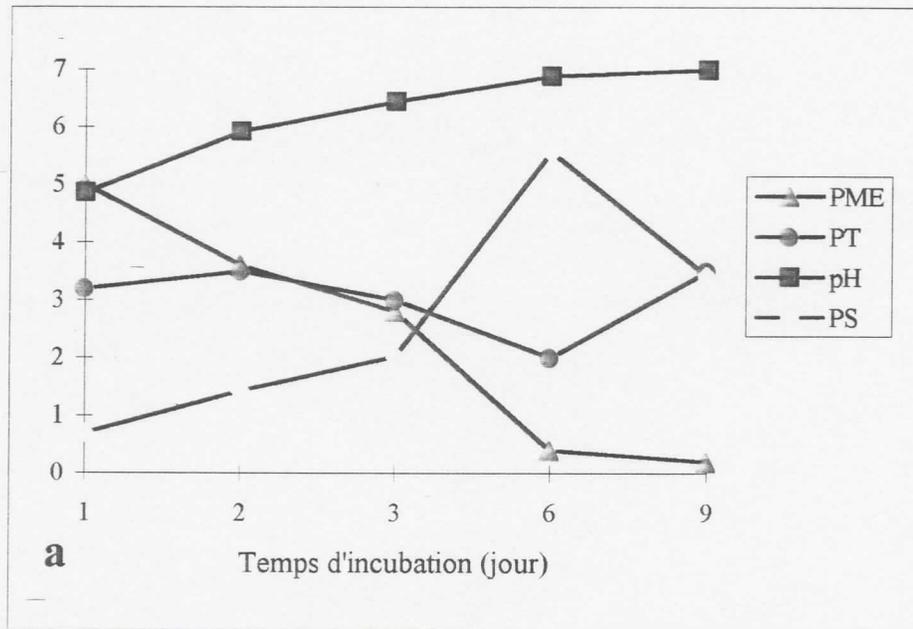


Fig 7. Activité des PME pour les deux isolats Sig (a) et Tessala (b) sur milieu Pectine 0.5% (PT : protéine totale, PS : poids sec)

**Tableau 25:** Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour la variation des activités des PME sur les trois milieux pour les isolats Tessala et Sig

**Analyse de variance**

Origine de fluctuation	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	55.07	29	1.90				
Facteur 1	16.80	2	8.40	107.93	0.0000		
Facteur 2	0.68	1	0.68	8.67	0.0182		
Facteur 3	25.66	4	6.42	82.42	0.0000		
Inter F1.F2	0.67	2	0.34	4.33	0.0529		
Inter F1.F3	10.16	8	1.27	16.31	0.0005		
Inter F2F3	0.47	4	0.12	1.52	0.2841		
Résiduelle	0.62	8	0.08				
						0.28	27.3%

Facteur1 = Milieu

Facteur2 = Isolat

Facteur3 = Temps d'incubation

**Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%**

**Facteur 1 :Milieu**

Nombre de moyennes            2        3  
 Valeurs des ppas                0.29    0.36

F1	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes		
3	M.Pectine	2.04	A		
1	DPC	0.77		B	
2	Mathur	0.26			C

**Facteur 2 :Isolats**

Nombre de moyennes            2        —  
 Valeurs des ppas                0.24

F2	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes	
1	Tess	1.17	A	
2	Sig	0.87		B

### Facteur 3 : Temps

Nombre de moyennes                    2                    3                    4                    5  
 Valeurs des ppas                    0.37                    0.46                    0.52                    0.56

F3	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes			
1	1er jour	2.40	A			
2	2ème jour	1.77		B		
3	3ème jour	0.78			C	
4	6ème jour	0.13				D
5	9ème jour	0.03				D

#### 2.2.1.7- Activité des endoglucanases (cellulases Cx)

Pour les deux isolats, l'activité des cellulases présente des optimums au pH 5 sur filtrat de Pectine et de Pois chiche, alors que sur filtrat glucose, l'optimum des activités se situe à pH 4.5.

L'isolat Tessala est très actif en Cx sur filtrat de Pectine et le milieu le moins favorable paraît être le DPC. Sur milieu MP, cette activité est maximale au troisième jour (Tableau 26).

L'isolat Sig présente des activités Cx élevées sur filtrats du milieu MP, et le milieu le moins favorable est également le DPC, ces activités ne sont révélées qu'après 24 heures au pH 5 (Tableau 27).

L'analyse de la variance met en évidence des différences significatives entre les trois milieux et entre les pH pour l'isolat Tessala. Le test de Newman-Keuls, classe en groupes homogènes les milieux et les pH (Tableau 28).

Pour l'isolat Sig, l'analyse de la variance met en évidence des différences significatives entre les milieux et des différences non significatives entre les pH. Les milieux sont classés ainsi en deux groupes (Tableau 28).

**Tableau 26:** Optimum des pH d'activité des cellulases (endoglucanases-Cx) de l'isolat d'*Ascochyta rabiei* (Tess) dans trois filtrats de culture.

#### Milieu mathur-pectine

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j
pH 4	-	-	-	-	-
pH 4.5	0.0054 2.70	0.0195 10	0.0259 13	0.0054 2.7	0.0013 a 0.675 b
pH 5	0.094 47	0.08 40	0.108 54	0.027 13.5	0.0094 a 4.7 b

\* Temps d'incubation du mélange réactionnel est de 1h'.

### Milieu mathur

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j
pH 4	-	-	-	-	-
pH 4.5	0.007 3.50	0.009 4.5	0.009 4.5	0.007 3.5	0.01 a 5.1 b
pH 5	- -	0.007 3.5	0.006 3	0.006 3	0.007 a 3.5 b

\*Temps d'incubation du milieu réactionnel est de 1h.

### Milieu diffusat de Pois chiche

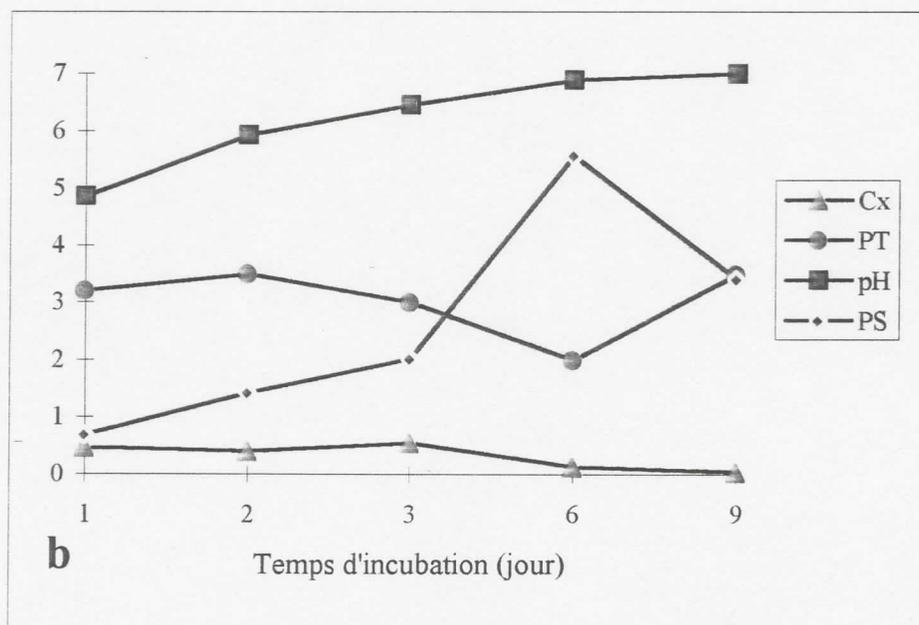
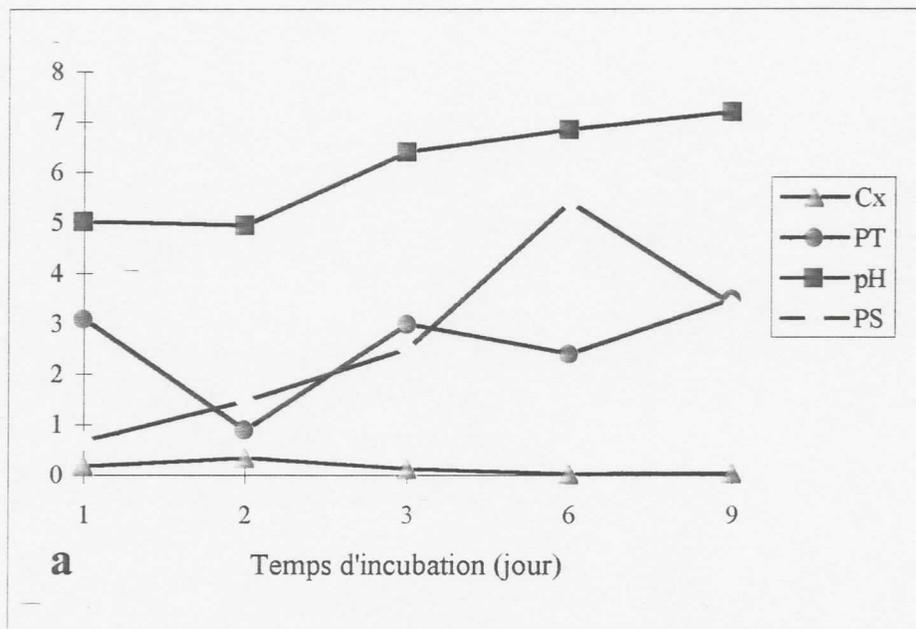
Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j
pH 4	-	-	-	-	-
pH 4.5	-	-	-	-	a - b
pH 5	0.0030 1.5	-	-	-	a - b

\* Temps d'incubation du milieu réactionnel est de 1h.

a- Concentration des sucres (glucose) en mg/ml.

b- Activité enzymatique exprimée en Unités/ml de filtrat/hx10<sup>4</sup>.

(-) aucune activité.



**Fig. 8** Activité des Cx pour les deux isolats Sig (a) et Tessala (b) sur milieu Pectine 0.5% (PT : protéine totale, PS : poids sec)

Tableau 27: Optimum des pH d'activité des cellulases (endoglucanases-Cx) de l'isolat *d'Ascochyta rabiei* (Sig) dans trois filtrats de culture.

**Milieu Mathur-Pectine**

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j	
pH 4	-	-	-	-	-	
pH 4.5	0.0153 7.70	0.020 10	0.0080 4	0.0080 4	0.01 5	a b
pH 5	0.035 18	0.067 34	0.025 12.6	0.0051 2.6	0.01 5	a b

\* Temps d'incubation du mélange réactionnel est de 1h.

**Milieu Mathur**

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j	
pH 4	-	-	-	-	-	
pH 4.5	0.009 4.50	0.004 2	0.004 2	0.004 2	0.006 3.0	a b
pH 5	0.0075 3.8	0.003 1.5	-	-	-	a b

\* Temps d'incubation du milieu réactionnel est de 1h.

**Milieu diffusât de Pois chiche**

Période d'incubation	24H	48H	3j	6j	9j	
pH 4	-	-	-	-	-	
pH 4.5	0.006 3	-	-	-	-	a b
pH 5	0.010 5	-	-	-	-	a b

\* Temps d'incubation du milieu réactionnel est de 1h.

a- Concentration des sucres (glucose) en mg/ml.

b- Activité enzymatique exprimée en Unités/ml de filtrat/hx10<sup>4</sup>.

(-) aucune activité.

**Tableau 28:** Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour la variation des activités des Cellulases sur trois milieux

**Analyse de variance (isolat Tessala)**

Origine de fluctuation	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	5678.39	29	195.81				
Facteur 1	1990.69	2	995.34	18.10	0.0012		
Facteur 2	508.57	1	508.57	9.25	0.0157		
Facteur 3	432.10	4	108.03	1.96	0.1929		
Inter F1.F2	1191.33	2	595.67	10.83	0.0056		
Inter F1.F3	907.17	8	113.40	2.061	0.1628		
Inter F2.F3	208.51	4	52.13	0.95	0.4854		
Résiduelle	440.01	8	55.00				
						7.42	99.4%

Facteur1 = Milieu

Facteur2 = pH

Facteur3 = Temps d'incubation

**Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%**

**Facteur 1 :Milieu**

Nombre de moyennes            2      3  
 Valeurs des ppas                7.66    9.47

F1	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes	
1	M.Pectine	18.83	A	
2	Mathur	3.41		B
3	DPC	0.15		B

**Facteur 2 :pH**

Nombre de moyennes            2  
 Valeurs des ppas                6.25

F2	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes	
2	pH 5	11.58	A	
1	pH 4.5	3.35		B

**Analyse de variance (isolat Sig)**

Origine de fluctuation	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	1418.01	29	48.90				
Facteur 1	539.85	2	296.92	17.02	0.0015		
Facteur 2	41.54	1	41.54	2.62	0.1418		
Facteur 3	207.46	4	51.86	3.27	0.0723		
Inter F1.F2	137.81	2	68.91	4.34	0.0525		
Inter F1.F3	280.83	8	35.10	2.21	0.1409		
Inter F2F3	83.62	4	20.90	1.32	0.3419		
Résiduelle	126.91	8	15.86				
						3.98	92.1%

Facteur1 = Milieu

Facteur2 = Temps d'incubation

Facteur3 = pH

**Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%**

**Facteur 1 :Milieu**

Nombre de moyennes

2

3

Valeurs des ppas

4.11

5.08

F1	Libellés	Moyennes	Groupes	homogènes
1	M.Pectine	10.29	A	
2	Mathur	1.88		B
3	DPC	0.80		B

## 2.2.2. Variation des activités enzymatiques sur milieu Mathur-Pectine des 8 isolats

### d'*Ascochyta rabiei*

#### 2.2.2.1-Variation du pH

Le pH du milieu de culture passe d'un pH 5 à un pH 7.2. Après 24 heures d'incubation, le milieu s'acidifie en passant des valeurs inférieures au pH 5, puis, au cours du temps, les pH se rapprochent de la neutralité. On note une acidification du milieu pendant les 3 premiers jours (Tableau 29).

L'analyse de la variance met en évidence des différences hautement significatives entre les isolats d'une part et entre les périodes d'incubation d'autre part.

Le test de Newman-Keuls classe les isolats en groupes homogènes ainsi que les temps d'incubation : deux groupes distincts et un groupe intermédiaire sans relation avec la virulence des groupes (Tableau 30).

**Tableau 29:** Evolution du pH en fonction du temps pour les 8 isolats d'*Ascochyta rabiei* sur milieu de culture Mathur-Pectine (moyenne de 3 essais).

Période d'incub.	0H	24H	48H	3j	6j	9j
Tess	5.0	4.86	5.63	6.45	6.89	7.00
Sig	5.0	5.02	4.95	6.40	6.85	7.20
Tia	5.0	4.80	5.13	5.93	6.68	6.81
8907	5.0	4.84	4.77	5.43	6.65	6.95
9003	5.0	4.55	4.06	4.00	6.46	6.48
To	5.0	4.39	4.18	4.60	6.51	6.59
Hatt	5.0	4.54	4.21	5.87	6.4	6.42
At	5.0	4.40	4.18	5.80	6.70	6.85

**Tableau 30:** Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour la variation du pH sur milieu P

**Analyse de variance**

Origine de fluctuation	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	45.68	47	0.97				
Facteur 1	4.38	7	0.63	4.51	0.0012		
Facteur 2	36.45	5	7.29	52.57	0.0000		
Résiduelle	4.85	35	0.14				
						0.37	6.7%

Facteur 1 = Isolat

Facteur 2 = Temps d'incubation

**Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%**

**Facteur 1 :Isolat**

Nombre de moyennes	2	3	4	5	6	7	8
Valeurs des ppas	0.44	0.53	0.58	0.62	0.65	0.67	0.69

F1	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes	
1	Tess	6.02	A	
2	Sig	5.90	A	
3	Tia	5.73	A	B
4	8907	5.61	A	B
8	AT	5.49	A	B
7	Hatt	5.41	A	B
6	To	5.21		B
5	9003	5.09		B

## Facteur 2 : Temps

Nombre de moyennes            2            3            4            5            6  
 Valeurs des ppas            0.38    0.46            0.50    0.54    0.56

F2	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes		
6	9ème jour	6.79	A		
5	6ème jour	6.64	A		
4	3ème jour	5.56		B	
1	0 heure	5.00			C
3	2ème jour	4.68			C
2	1er jour	4.68			C

### 2.2.2.2- Variation des poids pondéraux

Les poids pondéraux atteignent un maximum au sixième jour. Au neuvième jour, la croissance mycélienne régresse de près de 20 à 30% (Tableau 31).

L'analyse de la variance met en évidence des différences non significatives entre les isolats et des différences hautement significatives entre les périodes d'incubation (Tableau 32).

**Tableau 31:** Comparaison de l'évolution du poids pondéral *d'Ascochyta rabiei* en fonction du temps en mg/ml pour les 8 isolats sur milieu de culture Mathur-Pectine (moyenne de 3 essais).

Période d'incub.	24H	48H	3j	6j	9j
Tess	0.695	1.430	2.030	5.570	3.420
Sig	0.680	1.470	2.510	5.410	3.380
Tia	0.475	0.925	2.575	5.275	3.700
8907	0.575	0.950	3.375	4.725	3.500
9003	0.700	0.850	1.725	5.525	4.575
To	0.750	1.250	2.555	5.075	4.900
Hatt	1.125	1.250	2.950	4.650	4.610
At	0.500	0.970	2.450	5.725	4.700

**Tableau 32: Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour la variation du poids pondéral sur milieu Pectine**

**Analyse de variance**

Origine de fluctuation	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	126.16	39	3.23				
Facteur 1	0.65	7	0.09	0.44	0.8693		
Facteur 2	119.58	4	29.89	141.17	0.0000		
Résiduelle	5.93	28	0.21				
						0.46	16.8%

Facteur 1 = Isolats

Facteur 2 = Temps d'incubation

**Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%**

**Facteur 2 : Temps**

Nombre de moyennes	2	3	4	5
Valeurs des ppas	0.47	0.57	0.63	0.67

F2	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes			
4	9 <sup>e</sup> me jour	5.24	A			
5	6 <sup>e</sup> me jour	4.10		B		
3	3 <sup>e</sup> me jour	2.52			C	
2	2 <sup>e</sup> me jour	1.14				D
1	1 <sup>er</sup> jour	0.69				D

**2.2.2.3-Variation des concentrations des protéines totales dans le milieu**

Les concentrations des protéines pour tous les isolats, évaluées en mg/ml de filtrat, restent constantes pour les isolats Sig, Tessala, 90.07 et AT. Pour les autres isolats, elles présentent un maximum au neuvième jour (isolat 89.07) et au premier jour (isolats Hatt et Tia). En général, ces valeurs variant de 0.009 à 0.079 paraissent irrégulières (Tableau 33).

L'analyse de la variance met en évidence des différences significatives entre les isolats et des différences hautement significatives entre les périodes d'incubation.

Le test de Newman-Keuls, classe les isolats en groupes homogènes ainsi que les temps de culture (Tableau 34).

- Groupe très productif : isolat Tia
- Groupe moyennement productif : isolat 8907 - Tessala - 9003 - Hatt - AT - Sig
- Groupe faiblement productif : isolat To

**Tableau 33:** Concentration des protéines totales en mg/ml des 8 isolats d'*Ascochyta rabiei* sur filtrat de milieu de culture Mathur-Pectine

Période incub.	24H	48H	3j	6j	9j
Tess	0.031	0.009	0.030	0.024	0.035
Sig	0.032	0.035	0.030	0.020	0.035
Hatt	0.040	0.028	0.013	0.028	0.032
8907	0.035	0.021	0.022	0.028	0.079
To	0.032	0.012	0.018	0.020	0.024
9007	0.028	0.030	0.020	0.028	0.038
Tia	0.072	0.026	0.038	0.028	0.070
At	0.030	0.020	0.030	0.026	0.028

**Tableau 34:** Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour la variation des concentrations des protéines totales dans le milieu Pectine

**Analyse de variance**

Origine de fluct	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	0.01	39	0.00				
Facteur 1	0.00	7	0.00	2.69	0.0290		
Facteur 2	0.00	4	0.00	5.40	0.0024		
Résiduelle	0.00	28	0.00				
						0.01	35.2%

Facteur 1 = Isolat

Facteur 2 = Temps d'incubation

## Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%

### Facteur 1 :Isolat

Nombre de moyennes	2	3	4	5	6	7	8
Valeurs des ppas	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02

F1	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes	
7	Tia	0.05	A	
4	8907	0.04	A	B
2	Tess	0.03	A	B
6	9003	0.03	A	B
3	Hatt	0.03	A	B
8	AT	0.03	A	B
1	Sig	0.03	A	B
5	To	0.02		B

### Facteur 2 :Temps

Nombre de moyennes	2	3	4	5
Valeurs des ppas	0.01	0.01	0.01	0.02

F2	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes		
5	9ème jour	0.04	A		
1	1er jour	0.04	A	B	
4	6ème jour	0.03		B	C
3	3ème jour	0.03		B	C
2	2ème jour	0.02			C

#### **2.2.2.4- Variation des activités polygalacturonases (PG) au pH optimum 5**

Cette activité est détectée après 24 heures d'incubation et elle augmente après 48 heures mais reste stable durant toute la période d'incubation.

Les plus faibles activités enregistrées après 24 heures d'incubation sont relevées chez les isolats Sig et AT (Tableau 35).

L'analyse de la variance met en évidence des différences non significatives entre les isolats et des différences significatives entre les périodes d'incubation (Tableau 36).

**Tableau 35:** Comparaison des activités des polygalacturonases (PG) au pH d'activité optimum pH 5 pour les 8 isolats d'*Ascochyta rabiei* sur filtrat du milieu Mathur Pectine.

Période incub.	24H	48H	3j	6j	9j
Tess	0.23 217	0.26 245	0.305 287	0.305 287	0.11 a 103 b
Sig	0.07 66	0.305 287	0.302 284	0.305 287	0.302 284
Tia	0.220 207	0.302 284	0.305 287	0.305 287	0.302 284
8907	0.128 120	0.302 284	0.310 292	0.305 287	0.310 292
To	0.245 231	0.302 284	0.305 287	0.310 292	0.305 287
9007	0.300 283	0.310 292	0.305 287	0.305 287	0.310 292
Hatt	0.295 278	0.302 284	0.305 287	0.302 284	0.310 292
At	0.086 54	0.302 284	0.305 287	0.310 292	0.305 287

a- concentration des sucres (acide galacturonique) en mg/ml - Temps d'incubation 30'

b- activité enzymatique exprimée en Unités/ml de filtrat/heure x 10<sup>4</sup>

**Tableau 36:** Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour les activités des polygalacturonases sur milieu Pectine

**Analyse de variance**

Origine de fluctuation	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	153531.97	39	3936.72				
Facteur 1	17792.38	7	2541.77	1.00	0.4527		
Facteur 2	64545.84	4	16136.4 6	6.35	0.0010		
Résiduelle	71193.75	28	2542.63				
						50.42	19.4%

Facteur 1 = Isolat

Facteur 2 = Temps d'incubation

## Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%

### Facteur 2 :Temps

Nombre de moyennes	2	3	4	5
Valeurs des ppas	51.66	62.36	68.83	73.45

F2	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes	
4	6ème jour	287.88	A	
3	3 ème jour	287.25	A	
2	2 ème jour	280.50	A	
5	9 ème jour	265.13	A	
1	1 er jour	181.88		B

### **2.2.2.5- Variation des activités Pectine Lyases (PL) au pH d'activité optimum 10.5**

Les activités des PL présentes après 24 heures d'incubation ne commencent à augmenter qu'après 48 heures, puis chutent selon les isolats, soit après le deuxième jour, le troisième jour ou le sixième jour (Tableau 37).

L'analyse de la variance met en évidence des différences hautement significatives entre les isolats et entre les périodes d'incubation.

Le test de Newman-Keuls classe les isolats en 5 groupes homogènes, représentant des productivités décroissantes:

(Tableau 38).

-Gr1: Tessala

-Gr2: 8907

-Gr3: Hatt - 9003

-Gr4: AT - To - Sig

-Gr5: Tia

Les périodes d'incubation sont aussi classées par le test de Newman-Keuls en groupes homogènes (Tableau 38).

**Tableau 37:** Comparaison des activités des pectines lyases (PL) au pH d'activité optimum 10.5 pour les 8 isolats d'*Ascochyta rabiei* sur filtrat du milieu Mathur Pectine. (Temps d'incubation 30 mn)

Période d'incub.	24H	48H	3j	6j	9j
Tess	0.260 245	0.286 270	0.290 273	0.158 149	0.158 a 149 b
Sig	0.174 164	0.260 245	0.144 135	0.086 81	0.086 81
Tia	0.253 2380	0.253 238	0.228 215	0.144 135	0.098 92
8907	0.228 215	0.290 273	0.298 281	0.120 113	0.118 111
To	0.245 231	0.286 270	0.158 149	0.066 62	0.034 32
9007	0.210 198	0.272 256	0.184 173	0.064 60	0.116 109
Hatt	0.162 153	0.144 135	0.260 245	0.038 35	0.086 81
At	0.202 1900	0.260 245	0.168 158	0.098 92	0.086 81

a- Concentration des sucres (acide galacturonique) en mg/ml

b- Activité enzymatique exprimée en Unités/ml de filtrat/heure x 10<sup>4</sup>

**Tableau 38:** Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour les activités des pectinolyases (PL) dans le milieu Pectine

**Analyse de variance**

Origine de fluctuation	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	221945.89	39	5690.92				
Facteur 1	32118.70	7	4588.39	3.98	0.0039		
Facteur 2	157481.64	4	39395.41	34.21	0.0000		
Résiduelle	32245.55	28	1151.63				
						33.94	20.4%

Facteur 1 = Isolat

Facteur 2 = Temps d'incubation

### Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%

#### Facteur 1 :Isolat

Nombre de moyennes            2            3            4            5            6            7            8  
Valeurs des ppas            43.98    53.09    58.59    62.53    65.59    68.09    70.20

F1	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes		
2	Tess	217.20	A		
4	8907	198.60	A	B	
3	Hatt	183.60	A	B	C
6	9003	159.20	A	B	C
8	AT	153.20		B	C
5	To	148.80		B	C
1	Sig	141.20		B	C
7	Tia	129.80			C

#### Facteur 2 :Temps

Nombre de moyennes            2            3            4            5  
Valeurs des ppas            34.77    41.97    46.32    49.43

F2	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes	
2	2ème jour	241.50	A	
1	1er jour	204.25	A	
3	3 ème jour	203.63	A	
5	9 ème jour	92.00		B
4	6 ème jour	90.88		B

#### **2.2.2.6- Variation des activités Endoglucanases (Cellulase) au pH d'activité optimum 5**

Les Endoglucanases présentent des activités maximales après 48 heures pour la plupart des isolats: Sig, 89.07, To, 90.03, Tia et AT. Seul l'isolat Tessala montre une activité maximale dès 24 heures d'incubation et Hatt après six (06) jours d'incubation. Les isolats tels que Sig, To et AT présentent les plus faibles valeurs au début de l'incubation. En général, la production de cellulases chute au sixième ou au neuvième jour et parfois, elle s'annule pour les deux périodes (Tableau 39).

L'analyse de la variance met en évidence des différences non significatives entre les isolats et des différences hautement significatives entre les périodes d'incubation.

Le test de Newman-Keuls classe les périodes d'incubation en deux groupes homogènes (Tableau 40).

**Tableau 39: Comparaison des activités des cellulases (endoglucanases-Cx) au pH d'activité optimum pH 5 pour les 8 isolats d'*Ascochyta rabiei* sur filtrat du milieu Mathur Pectine (moyenne de 3 essais).**

Période d'incub.	24H	48H	3j	6j	9j
Tess	0.074 47	0.080 40	0.108 54	0.027 13.6	0.0094 a 4.7 b
Sig	0.035 18	0.067 34	0.025 12.6	0.0051 2.6	0.01 5
Tia	0.076 38.4	0.094 47	0.081 41	0.01 5	- -
8907	0.066 33.7	0.086 43.8	0.067 33.7	- -	- -
To	0.052 26.3	0.065 33	0.025 12.8	- -	- -
9007	0.072 36.4	0.076 38.4	0.060 30.3	0.016 8	- -
Hatt	0.0667 33.7	0.063 32	0.033 16.5	0.1 50.5	- -
At	0.031 21	0.260 245	0.022 11	0.0051 2.6	- -

a- concentration des sucres (glucose) en mg/ml

b- activité enzymatique exprimée en Unités/ml de filtrat/heure x 10<sup>4</sup>

(-) activité non détectée.

-Temps d'incubation (1 h)

**Tableau 40:** Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour les activités des cellulases sur milieu Pectine

**Analyse de variance**

Origine de fluctuation	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	12059.60	39	309.22				
Facteur 1	1616.40	7	230.91	2.13	0.0725		
Facteur 2	7412.20	4	1853.05	17.12	0.0000		
Résiduelle	3030.99	28	108.25				
						10.40	48.5%

Facteur 1 = Isolat

Facteur 2 = Temps d'incubation

**Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%**

**Facteur 2 :Temps**

Nombre de moyennes	2	3	4	5
Valeurs des ppas	10.66	12.87	14.20	15.16

F2	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes	
2	2 <sup>ème</sup> jour	37.56	A	
1	1 <sup>er</sup> jour	31.81	A	
3	3 <sup>ème</sup> jour	26.49	A	
4	6 <sup>ème</sup> jour	10.29		B
5	9 <sup>ème</sup> jour	1.21		B

**2.2.2.7- Variation des activités Pectinéméthylésterases (PME)**

Les activités PME sont présentes après 24 heures d'incubation dans les filtrats de culture. Après cette période, la sécrétion chute et même s'annule pour To au sixième jour. Pour Sig et Hatt, elle s'annule au neuvième jour. En général, au neuvième jour, l'activité est très faible pour tous les isolats (Tableau 41).

L'analyse de la variance met en évidence des différences hautement significatives entre les isolats et entre les périodes d'incubation.

Le test de Newman-Keuls donne six groupes homogènes pour les isolats et pour les périodes d'incubation (Tableau 42).

On distingue 6 groupes:

- Gr 1: isolat 9003
- Gr 2: isolat Tia et 8907
- Gr 3: isolat AT et Tessala
- Gr 4: isolat Hatt
- Gr 5: isolat Sig
- Gr 6: isolat To

**Tableau 41:** Activité de la PME en fonction du temps pour les 8 isolats d'*Ascochyta rabiei*. Milieu de culture Mathur-Pectine (moyenne de 3 essais).

Dosage par titration. 1U d'activité PME est définie comme la quantité d'enzyme demandant 1 ml équivalent d'NaOH/h/ml de filtrat.

Période d'incub.	24H	48H	3j	6j	9j
Tess	5.00	3.60	2.80	0.40	0.20
Sig	4.00	3.00	1.00	0.40	0.00
Tia	5.60	4.40	3.00	1.80	1.40
8907	7.40	4.40	1.80	1.40	0.40
9003	8.00	5.00	4.00	3.00	1.60
To	4.00	0.80	0.40	0.00	0.00
Hatt	5.00	2.60	2.00	1.80	0.00
At	5.60	3.00	2.00	1.60	0.40

**Tableau 42:** Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour les activités des pectinéméthylesterases (PME) sur le milieu Pectine

**Analyse de variance**

Origine de fluct.	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	171.80	39	4.41				
Facteur 1	125.87	7	31.47	81.36	0.0000		
Facteur 2	35.10	4	5.01	12.96	0.0000		
Résiduelle	10.83	28	0.39				
						0.62	24.2%

Facteur 1 = Isolat

Facteur 2 = Temps d'incubation

**Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%**

**Facteur 2 :Isolat**

Nombre de moyennes

2            3            4            5            6            7            8

Valeurs des ppas —

0.81    0.97            1.07    1.15            1.20    1.25    1.29

F2	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes			
6	9003	4.32	A			
7	Tia	3.24		B		
4	8907	3.08		B		
8	AT	2.52		B	C	
2	Tess	2.40		B	C	
3	Hatt	2.28		B	C	D
1	Sig	1.68			C	D
5	To	1.04			C	D

### Facteur 1 :Temps

Nombre de moyennes            2            3            4            5  
 Valeurs des ppas            0.64       0.77       0.85       0.91

F1	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes			
1	1 <sup>er</sup> jour	5.57	A			
2	2 <sup>ème</sup> jour	3.35		B		
3	3 <sup>ème</sup> jour	2.13			C	
4	6 <sup>ème</sup> jour	1.30				D
5	9 <sup>ème</sup> jour	0.50				E

### 2.2.2.8- Recherche des activités hydrolases et transéliminases: Méthode à l'acide thiobarbiturique (TBA)

Dans cette étude, seul le filtrat de culture âgé de trois jours est analysé car, selon les résultats, les activités PL et PG sont à leur maximum. Les résultats confirment l'existence d'activités hydrolases par la mesure des densités optiques à la longueur d'onde 550 et les transéliminases à la longueur d'onde 515 (Tableau 43).

L'obtention d'un pic à 515 nm est considérée comme l'évidence de l'existence d'une PG et un pic à 550 est l'évidence de l'existence d'une PL (Sherwood, 1966).

**Tableau 43:** Densité optique des pics des activités hydrolases et transéliminases: méthode à l'acide thiobarbiturique (T.B.A) (filtrat de culture de 3 jours d'incubation) (Milieu Mathur-Pectine MP).

Isolat \ DO	L.o 515 Substrat: A.polyG pH 5	L.o 550 Substrat: Pectine pH 10
Tessala	0.04	0.10
Sig	0.03	0.06
To	0.02	0.05
Tia	0.03	0.06
Hatt	0.04	0.15
8907	0.06	0.10
9003	0.04	0.16
At	0.02	0.06

### 2.2.3- DISCUSSION

*Ascochyta rabiei* produit des enzymes dégradant la paroi cellulaire *in vitro* (Tchicha, 1990). D'autres champignons sont aussi capables de cette performance tels que *Ascochyta pisi*, *Fusarium oxysporum f.sp. ciceri*, *Verticillium alboatrum* (Bouznad, 1983; Carder et al., 1987; Perès Artès et Tena, 1990).

Bateman et Millar (1966) ont montré que les conditions de culture et la composition du milieu peuvent influencer nettement la production *in vitro* des enzymes dégradant la paroi cellulaire. Cette approche d'incorporation de différentes sources de carbone dans le milieu, permet de rechercher la nature inductive de ces enzymes. Ainsi, notre étude nous a permis de tester l'influence de différents milieux sur la production d'enzymes et leur activités.

En particulier, les deux isolats étudiés produisent dans les trois milieux, des polygalacturonases (PG), des Pectine-lyases (PL), des Pectines méthylestérases (PME ou PE) et des Endoglucanases (Cellulases, Cx). Leurs sécrétions varient selon le milieu et parfois selon l'isolat. Elles sont aussi sujet aux effets inductifs par les substrats spécifiques. Ainsi le milieu Pectine favorise la production d'enzymes pectolytiques et de cellulases plus que le milieu glucose, ce qui suggère aussi que ces enzymes soient en partie constitutives. D'autres auteurs rapportent également que les PG sont constitutives (Bateman et Millar, 1966; Lisker et al, 1975; Olutiola, 1982).

Contrairement à nos résultats où elles sont décelées dès 24 heures d'incubation, la production tardive de cellulases sur milieu glucose est signalée par d'autres auteurs (Olutiola, 1982; Osagie et Obuekwe, 1991).

Le milieu le plus favorable pour la production des PG, PL et PME est le milieu Pectine suivi par le milieu DPC pour les PL et PME et par le milieu M pour les PG.

Les pH des trois milieux augmentent au cours des périodes d'incubation, et ne semblent pas influencer la production des différentes enzymes.

La croissance mycélienne est favorisée par un milieu riche en Pectine. Toutefois, cette croissance chute après le sixième jour. Dans certains cas, elle est suivie par l'activité des PG, comme cela a été signalé par Carder et al (1987).

La diminution des activités PG dans le milieu de culture après le sixième jour peut être attribué à l'effet toxique des métabolites tels que les acides sécrétés par les champignons vieillissant dans le milieu de croissance (Pelizar et Reed, 1972- cité par Osagie et Obuekwe, 1991).

L'activité des PG est similaire pour les deux isolats sur milieu Pectine. Par contre, l'isolat Sig est plus actif pour les PG sur milieu glucose (M), ce qui suggère que les PG pour l'isolat Tessala sont plus inductives que constitutives, ce qui expliquerait peut être son niveau d'agressivité élevé.

Les activités des PG évoluent en fonction de la croissance mycélienne chez l'isolat Tess., ce qui ne paraît pas être le cas pour l'isolat Sig, où les activités PG ne chutent pas après le sixième jour.

Ces deux isolats sécrètent donc des PL dans les trois milieux, et leurs activités ne semblent pas être influencées par le pH du milieu, contrairement aux travaux de **Sherwood (1966)** qui ne détecte les PL qu'une fois que le milieu atteint le pH 6, les PL d'*Ascochyta rabiei* sont sécrétées en dehors de ces valeurs de pH.

Ces activités ne semblent pas être corrélées avec la croissance mycélienne, ni à celles des protéines totales pour les deux isolats (Fig 6).

Les isolats sécrètent des PME dans les trois milieux avec des niveaux élevés le premier jour, puis diminuent au cours de l'incubation, alors qu'**Osagie et Obuekwe (1991)** rapporte que *Fusarium oxysporum f.sp. elaeidis* produit des PE avec des taux augmentant dans le temps. Ceci suggère dans notre cas que les PL sont influencées par l'âge de la culture ou la variation du pH, ou alors par la présence des métabolites répressifs suite à la sécrétion d'autres enzymes PG et PL.

Le rôle potentiel des PE chez les champignons pathogènes a été détaillé par **Wood (1960)** et **Bateman et Millar (1966)**. **Osagie et Obuekwe (1991)** trouvent que la production des PE est influencée par le pH du milieu et est favorisée par des pH 7.4 et 8.4, ce qui n'est pas le cas pour nos isolats.

L'évolution des activités PME ne semble pas suivre celle de la croissance mycélienne, ni celle des protéines totales chez les deux isolats (Fig 8).

L'analyse statistique donne une corrélation positive entre la production des PE et la virulence des isolats pour les trois milieux de culture.

Les isolats d'*Ascochyta rabiei* sécrètent aussi des endoglucanases dans les trois milieux. Beaucoup de champignons pathogènes de plantes sécrètent des cellulases tels que *Penicillium citrinum*, *Fusarium oxysporum f. sp. Elaeidis* (**Olutiola, 1982; Osagie et Obuekwe, 1991**).

La quantité sécrétée diffère selon le milieu et l'isolat. Les optimums d'activités sont obtenus à deux pH différents selon le milieu; au pH 5 pour le milieu Pectine et au pH 4.5 pour le milieu glucose. Ceci suggère que les formes de cellulases sécrétées par le champignon diffèrent selon le milieu.

Les activités Cx ne semblent pas suivre l'évolution de la croissance mycélienne, ni la production de protéines totales (Fig 7). Les cellulases sécrétées sont donc en partie constitutives puisque elles sont présentes même en absence du substrat spécifique. Ceci est aussi juste pour d'autres champignons (**Olutiola, 1982; Osagie et Obuekwe, 1991**).

L'étude comparative des activités des 8 isolats sur milieu Pectine aux pH optimums montre des activités statistiquement variables pour les PL et PME, elles sont semblables entre les isolats pour les PG et Cx.

La variation du pH du milieu ne paraît pas être influencée ni par la virulence ou l'agressivité des groupes des isolats, ni par la croissance mycélienne, ni même par la production des protéines totales.

La croissance est semblable pour tous les isolats et la concentration en protéines totales est statistiquement variable entre les isolats, mais sans relation avec la virulence.

En revanche, la faible production de PG après 24 heures d'incubation chez les isolats Sig et AT, suggère une corrélation positive entre l'activité des PG et la virulence des isolats, bien que l'analyse

statistique montre des activités semblables pour tous les isolats. De même, des taux élevés de PL enregistrés par les isolats agressifs, tels que Tessala, 89.07, Hatt et 90.03, suggère une corrélation positive entre l'agressivité élevée de ces isolats et les niveaux élevés des PL.

La sécrétion des PME chute au cours du temps dans le milieu Pectine pour les isolats étudiés. Elle s'annule même pour les isolats To, Sig et Hatt en fin de période d'incubation. Les activités semblent être corrélées avec la virulence des champignons, bien que l'isolat AT et Tess présentent les mêmes activités alors qu'ils appartiennent à deux groupes d'agressivité différente. Ceci est peut être dû à l'influence des conditions de culture.

La production de cellulases n'apparaît pas être corrélée avec la virulence des isolats bien que les isolats Sig, To et AT, de faible agressivité, présentent les plus faibles activités.

Cette étude fait ressortir une corrélation positive entre la virulence du groupe et la capacité des isolats à produire des enzymes dépolymérisantes tels que PL et PME, ce qui n'est pas le cas pour les activités PG et Cx. Ceci est peut être dû aux conditions de cultures *in vitro*, qui ne présentent pas un environnement favorable à l'expression de la virulence des isolats telle que la plante hôte. Cependant, cette corrélation négative n'est pas absolue. Les isolats faibles peuvent produire de plus grandes quantités de PG et de PL autant que beaucoup d'isolats pathogènes (Carder et al., 1987).

### 3.- Evaluation *in vivo* des activités pectolytiques et cellulolytiques sur deux cultivars de Pois chiche (résistant et sensible) suite à une inoculation par deux isolats d'*Ascochyta rabiei*

Dans une interaction hôte - parasite, l'hôte a une action sur les activités du pathogène qui peuvent être variées selon le niveau de résistance de la plante. D'autre part, le pathogène pourra avoir une activité différente selon son niveau d'agressivité. Pour mettre en évidence ces interactions, une étude *in vivo* s'impose.

Dans cette étude, quatre (04) types d'interactions sont comparées:

Groupe a:

- Cultivar résistant / Tessala, isolat agressif
- Cultivar résistant / Sig, isolat faiblement agressif

Groupe b:

- Cultivar sensible / Tessala
- Cultivar sensible / Sig

Le témoin: ce sont des plants non inoculés de même sensibilité.

#### 3.1- Production des polygalacturonases (PG) *in vivo*

Des activités PG sont détectées dans les extraits des plantes inoculées ou non. Dans les extraits témoins, l'activité reste invariable. Sur plantes inoculées, l'activité est recherchée dès l'apparition des premiers symptômes.

Au niveau de l'interaction sensible/ faiblement agressive (S / Pa), l'activité est maximale dès le troisième jour d'incubation (apparition des premiers symptômes), et seulement au neuvième jour au niveau des interactions résistant / agressive (R / A); résistant / p agressive (R / pa) et sensible / agressive (S/A) (Tableau 44).

Les polygalacturonases semblent moins actives chez les cultivars résistants. L'isolat Tessala paraît plus productif en PG *in vivo* que l'isolat Sig, mais l'analyse statistique ne montre aucune différence, comme le révèle l'analyse *in vitro*.

Après 15 jours d'incubation (date où le cultivar sensible atteint la valeur 9 sur l'échelle d'évaluation), l'activité de ces enzymes diminue, peut être en raison du manque du stimulus.

L'analyse de la variance met en évidence une différence hautement significative entre les traitements et des différences non significatives entre les périodes d'incubation (Tableau 45).

Le test de Newman-Keuls classe les interactions en groupes homogènes; les traitements forment un groupe unique. Ce qui veut dire que l'activité PG est pareille quelque soit l'interaction, sauf que cette activité est due à la présence du pathogène (Tableau 45).

**Tableau 44** Activité des polygalacturonases (PG) *in vivo* de 2 isolats d'*Ascochyta rabiei* (Tessala et Sig) inoculés sur deux cultivars de Pois chiche

Période d'incub.	3j	6j	9j	15j
Témoin	0.426	0.426	0.426	0.426 a
plante n.in	201	201	201	201 b
Cultivar S	1.05	0.84	1.133	0.99
+Tessala	496	396	534	471
Cultivar R	0.82	0.85	1.12	0.81
+Tessala	390	402.5	528	383
Cultivar S	1.12	0.70	1.08	0.93
+Sig	528	333	509	440
Cultivar R	0.51	0.69	1.05	0.9
+Sig	243	327	497	427

a- concentration des sucres (acide galacturonique) en mg/ml - Temps d'incubation (lh)

b- activité enzymatique exprimée en Unités/ml de filtrat/heure x 10<sup>4</sup>

S- cultivar sensible

R- cultivar résistant

**Tableau 45:** Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour les activités des (PG) *in vivo*

Analyse de variance

Origine de fluctuation	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	277633.66	19	14612.30				
Facteur 1	192719.72	4	48179.93	12.50	0.0004		
Facteur 2	38661.25	3	12887.08	3.34	0.0555		
Résiduelle	46252.69	12	3854.39				
						62.08	16.1%

Facteur 1 = Hôte-parasite

Facteur 2 = Temps d'incubation

## Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%

### Facteur 1 :Hôte-parasite

Nombre de moyennes            2            3            4            5  
Valeurs des ppas            95.73      117.01    130.26    139.90

F1	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes	
3	S+T	474.25	A	
4	S+S	452.50	A	
2	R+T	425.88	A	
5	R+S	373.50	A	
1	TNI	201.00		B

### **3.2- Production des pectines-lyases (PL) *in vivo***

Ces enzymes sont détectées dans les extraits de plantes qu'elles soient inoculées par les deux isolats ou non. La présence des PL dans des plantes saines semble être anormale, puisque ces enzymes sont strictement d'origine microbienne. Ceci peut suggérer une infection latente due à une contamination au niveau des semences.

Les extraits sont analysés dès l'apparition des symptômes, toutefois, l'activité des PL reste invariable chez les plantes non inoculées. Au niveau des interactions, par contre, elle augmente en général, et elle atteint son maximum au sixième jour, sauf pour le couple (R / A), où dès le troisième jour, la production est maximale. Cette activité baisse ensuite de 50% à 80% au quinzième jour. Les activités les plus élevées sont révélées chez le couple S/A (Tableau 46).

L'analyse de la variance met en évidence des différences significatives entre les différents types d'interactions et entre les périodes d'incubation.

Le test de Newman-Keuls classe les interactions en trois groupes homogènes (Tableau 47):

- Gr 1: S/A très productif de PL
- Gr 2: S/pA, R/pA et R/A moyennement productif
- Gr 3: Témoin

**Tableau 46 :** Activité des pectines lyases(PL) in vivo de 2 isolats d'*Ascochyta rabiei* (Tessala et Sig) inoculés sur deux cultivars de Pois chiche

Période d'incub.	3j	6j	9j	15j
Témoin	0.333	0.333	0.333	0.333 a
plante n.in	157	157	157	157 b
Cultivar S +Tessala	0.696 328	0.96 427	0.57 270	0.56 264
Cultivar R +Tessala	0.68 320.7	0.57 270	0.333 157	0.333 157
Cultivar S +Sig	0.57 270	0.96 452	0.56 264	0.227 107
Cultivar R +Sig	0.56 264	0.85 402	0.36 170	0.199 094

a-concentration des sucres (acide galacturonique) en mg/ml

b- activité enzymatique exprimée en Unités/ml de filtrat/heure x 10<sup>4</sup>

S- cultivar sensible

R- cultivar résistant

- Temps d'incubation 1h.

**Tableau 47:** Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour les activités des pectinolyases (PL) in vivo

Analyse de variance

Origine de fluctuation	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	209980.59	19	11051.61				
Facteur 1	59928.13	4	14982.03	3.42	0.0436		
Facteur 2	97489.13	3	32496.38	7.42	0.0047		
Résiduelle	52563.34	12	4380.28				
						66.18	27.3%

Facteur 1 = Hôte-parasite

Facteur 2 = Temps d'incubation

## Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%

### Facteur 1 :Hôte-parasite

Nombre de moyennes            2            3            4            5  
Valeurs des ppas            102.05    124.73   138.86   149.14

F1	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes	
2	S+T	322.25	A	
4	S+S	273.25	A	B
5	R+S	232.50	A	B
3	R+T	226.18	A	B
1	TNI	157.00		B

### Facteur 2 :Temps

Nombre de moyennes            2            3            4  
Valeurs des ppas            91.27    111.56   124.20

F2	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes		
2	6 <sup>e</sup> me jour	341.60	A		
1	3 <sup>e</sup> me jour	267.94	A	B	
3	9 <sup>e</sup> me jour	203.60		B	C
4	15 <sup>e</sup> me jour	155.80			C

### **3.3- Production des endoglucanases (Cellulase, Cx)**

Ces enzymes sont présentes dans les extraits de plantes inoculées et saines. Les activités évaluées au niveau des interactions, seraient celles de la plante et celles dues à la présence du champignon.

La production est élevée au niveau de l'interaction S/A par comparaison à l'interaction R/A; il en est de même pour l'interaction S/p.A par rapport à R/p.A. L'isolat agressif est plus productif sur le cultivar sensible.

En général, l'activité des cellulases est à son maximum au troisième jour pour la relation S/A et au sixième jour pour la relation R/A. Pour tous les traitements, la production chute au quinzième jour (Tableau 48).

L'analyse de la variance met en évidence des différences hautement significatives entre les traitements et des différences seulement significatives entre les périodes d'incubation.

Le test de Newman-Keuls classe les interactions en groupes homogènes. Ainsi les couples R/A et S/p.A sont dans un groupe intermédiaire entre le groupe formé par S/A et le groupe formé par R/p.A. Le témoin est dans le même groupe que le couple R/p.A (Tableau 48). Ainsi, le couple S/A est le plus productif en Cx et donc l'isolat Tessala est plus actif in vivo quelque soit la sensibilité du cultivar (Tableau 49).

**Tableau 48:** Activité des cellulases (Endoglucanases-cx) de 2 isolats d'*Ascochyta rabiei* (Tessala et Sig) inoculés sur deux cultivars de Pois chiche

Période d'incub.	3j	6j	9j	15j
Témoin plante n.in	0.059 10	0.059 10	0.059 10	0.059 a 10 b
Cultivar S +Tessala	0.34 56	0.24 40	0.31 52	0.04 7
Cultivar R +Tessala	0.11 18.5	0.19 31	0.24 40	0.07 12
Cultivar S +Sig	0.11 18.5	0.20 33.5	0.16 27	0.09 15
Cultivar R +Sig	0.009 15	0.015 25	0.009 15	0.004 7

a- concentration des sucres (glucose) de en mg/ml .

S- cultivar sensible

b- activité enzymatique exprimée en Unités/ml de filtrat/heure x 10<sup>4</sup>  
- Temps d'incubation (3h)

R- cultivar résistant

**Tableau 49:** Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour les activités des Cx in vivo

**Analyse de variance**

Origine de fluctuation	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	4240.94	19	223.21				
Facteur 1	1914.00	4	478.50	4.70	0.0164		
Facteur 2	1106.44	3	368.81	3.63	0.0450		
Résiduelle	1220.50	12	101.71				
						10.09	44.6%

Facteur 1 = Hôte-parasite

Facteur 2 = Temps d'incubation

### Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%

#### Facteur 1 :Hôte-parasite

Nombre de moyennes            2            3            4            5  
Valeurs des ppas            15.55      19.01    21.16    22.73

F1	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes	
2	S+T	38.75	A	
3	R+T	25.38	A	B
4	S+S	23.50	A	B
5	R+S	15.50		B
1	TNI	10.00		B

#### Facteur 2 :Temps

Nombre de moyennes            2            3            4  
Valeurs des ppas            13.91      17.00      18.93

F2	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes
3	9ème jour	28.80	A
2	6 ème jour	27.90	A
1	3 ème jour	23.60	A
4	15 ème jour	10.20	A

### **3.4- Production des Pectinéméthylestérases (PME)**

Comme pour les PL, les PME sont également révélées chez les plantes non inoculées. Cependant, elles augmentent progressivement du troisième jour au quinzième jour après l'inoculation et semblent aussi élevées chez les cultivars sensibles que chez les cultivars résistants.

Ainsi, l'isolat agressif paraît plus productif que l'isolat peu agressif, et ce quelque soit la sensibilité de la plante (Tableau 50).

Toutefois, l'analyse de la variance montre des différences non significatives entre les traitements et des différences seulement significatives entre les périodes d'incubation.

Le test de Newman-Keuls classe les périodes d'incubation en groupes homogènes (Tableau 51).

**Tableau 50:** Activité des pectines méthylesterases (PME) de 2 isolats d'*Ascochyta rabiei* (Tessala et Sig) inoculés sur deux cultivars de Pois chiche. Une unité d'activité PME est définie comme la quantité ajoutée d'NaOH/h/ml d'enzyme pour obtenir un pH 8.

Période d'incub.	A 3j	6j	9j	b 15j
Témoin plante n. inoc.	1.4	1.4	1.4	1.4
Cultivar S +Tessala	1.8	2.0	2.8	6.4
Cultivar R +Tessala	1.6	2.5	4.8	6.0
Cultivar S +Sig	1.6	1.8	2.5	6.0
Cultivar R +Sig	1.4	1.6	2.0	5.6

a- Le 3ème jour correspond à l'apparition des 1ers symptômes

b- Le 15ème jour correspond à l'atteinte de la note 9 sur l'échelle d'évaluation pour le cultivar sensible

S- cultivar sensible

R- cultivar résistant

**Tableau 51:** Analyse de la variance et test de NEWMAN-KEULS pour les activités des PME in vivo

**Analyse de variance**

Origine de fluctuation	S.C.E	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V
Totale	62.86	19	3.31				
Facteur 1	12.28	4	3.07	2.97	0.0642		
Facteur 2	38.15	3	12.72	12.28	0.0006		
Résiduelle	12.43	12	1.04				
						1.02	36.3%

Facteur 1 = Hôte-parasite

Facteur 2 = Temps d'incubation

## Test de NEWMAN-KEULS - Seuil=5%

### Facteur 2 :Temps

Nombre de moyennes      2      3      4  
Valeurs des ppas          1.40      1.72      1.91

F2	Libellés	Moyennes	Groupes	homogènes
4	15 <sup>e</sup> me jour	5.08	A	
3	9 <sup>e</sup> me jour	2.70		B
2	6 <sup>e</sup> me jour	1.86		B
1	3 <sup>e</sup> me jour	1.56		B

### 3.5- Discussion

Les isolats d'*Ascochyta rabiei* (Sig) faiblement agressif et (Tessala) agressif produisent *in vivo* des activités PG, PL, PME et Cx.

Selon l'analyse statistique, les activités PG sont du même niveau chez toutes les interactions hôte-pathogène alors que les activités PL et Cx se sont révélées différentes selon l'interaction. Celles-ci sont plus élevées sur les cultivars sensibles que sur les cultivars résistants. Il est intéressant de noter que les activités PG présentent des pics très tôt (troisième jour) au niveau des cultivars sensibles et plus tard (neuvième jour) sur les cultivars résistants. Ainsi, les cultivars résistants ne permettent pas la même performance en production enzymatique que les cultivars sensibles, surtout pour les PL et Cx. Certains rapports signalent que les parois cellulaires de beaucoup d'espèces de plantes ont une influence différentielle sur la production de certaines enzymes dégradant la paroi, et dans beaucoup de cas, ces effets peuvent être relatés sur une résistance générale ou spécifique. Les parois d'hôtes peuvent aussi contribuer à l'incompatibilité de certaines interactions plante-pathogène à travers leurs effets sur l'activité des enzymes pectiques. Ainsi, l'inactivation des enzymes pectiques par des protéines des parois (Albersheim et Anderson, 1971) ou par des liaisons aux parois cellulaires (Mussell et Strand, 1977) a été impliquée dans les réactions de résistances.

El Biari (1995) note dans son étude sur le polymorphisme d'*Ascochyta rabiei* que des milieux à base de Pois chiche provenant de cultivars « S » sont plus favorables à la croissance que les milieux provenant de cultivars « R ». Il suggère que la paroi cellulaire pourrait jouer un rôle déterminant dans le mécanisme de résistance du Pois chiche à *Ascochyta rabiei*.

Pour certaines enzymes, les niveaux d'activités sont liées au degré d'agressivité des isolats. Ainsi, **Mussell et Green (1970)** observent des niveaux d'activités PL plus élevés chez les plantes infectées par des isolats virulents de *Verticillium* que sur les plantes infectées par des isolats moins virulents. Ceci est observé dans notre cas aux niveaux des activités PL et Cx. Pour les PL, le même comportement est observé uniquement dans le cultivar sensible, et pour les deux interactions dans le cas des cellulases.

Les activités pectines-lyases (PL) chez les cultivars résistants sont du même niveau quelque soit l'agressivité de l'isolat, alors que les activités cellulases Cx sont moins élevées chez le cultivar résistant inoculé par l'isolat faiblement agressif que chez le même cultivar inoculé par l'isolat agressif. Ceci suggère que la production des cellulases est plus liée à la virulence que la production des PL.

Contrairement à l'étude *in vitro* où l'activité diminue progressivement durant la période d'incubation, la production des PME est progressive dans le temps. L'activité de ces enzymes est la même quelque soit l'interaction et forment un même groupe avec le témoin, ce qui suggère un rôle secondaire des PME dans la pathogénèse. De même, leur production n'est pas corrélée avec l'agressivité des isolats comme le montre l'étude *in vitro*.

Les isolats agressifs paraissent plus productifs d'enzymes que les isolats faiblement agressifs, ceci est vrai surtout pour les activités PL et Cx. Ainsi, la corrélation positive entre la virulence des isolats et les activités enzymatiques révélée dans l'étude *in vitro* est confirmée par les résultats obtenus sur le végétal.

Les résultats de cette étude suggèrent que les activités sont contrôlées par l'interaction et donc par la paroi cellulaire d'un côté et d'un autre côté par le pathogène.

## 4- Etudes du polymorphisme électrophorétique des protéines et isozymes chez

### *Ascochyta rabiei*

L'étude du polymorphisme est mise en évidence avec plus de spécificité, par le profil électrophorétique des enzymes chez un organisme, et donc, permet de mieux analyser la variabilité génétique. Les méthodes électrophorétiques ont permis de caractériser un grand nombre de protéines et d'isozymes chez les champignons (Cruickshank, 1983; Cruickshank et Pitt, 1987; Cruickshank, 1990; Milales et al., 1986; Nguyen-The et al., 1984; Osagie et Obwekue, 1991; Ried et Collmer, 1985).

Chez *Ascochyta rabiei*, le polymorphisme a été recherché par l'utilisation de critères morphologiques, physio-pathologiques et plus récemment, par des études des profils de protéines et d'isozymes solubles du mycélium (Labdi, 1990 et Elbiari, 1995).

Selon l'étude d'Elbiari (1995), ce polymorphisme est plus important que celui obtenu par la technique RAPD, et a mis en évidence une différenciation génétique au niveau de certaines sous-populations.

L'étude du polymorphisme chez les isolats d'*Ascochyta rabiei*, par l'utilisation de protéines impliquées dans le pouvoir pathogène; telles que les enzymes pectinolytiques et cellulolytiques pourrait montrer des variabilités en relation avec l'agressivité des isolats. Les résultats présentés dans ce chapitre ont pour but de rechercher le polymorphisme chez *A. rabiei* par analyse des profils des protéines totales et des isozymes d'estérases du filtrat des cultures et des profils des activités des isozymes, des pectinases et des cellulases.

#### 4.1- Protéines totales natives extracellulaires

Les profils des protéines extracellulaires des gels de la minicuve révélées au bleu de coomasie sont similaires pour les isolats testés sur milieu Pois chiche (PC) ( Sig, TO, AT, Tess, Hatt). Neuf (09) bandes de protéines natives existent par profil. Les bandes apparaissent avec plus ou moins d'intensité, qui serait due au niveau de concentration des protéines dans le milieu. Une bande majeure (Rf 0,37) apparaît sur tous les profils et semble spécifique à l'espèce ou au genre. La bande de faible vitesse de migration (Rf 0.10) semble provenir du milieu de culture et donc c'est une protéine du Pois chiche. Celle-ci apparaît sur tous les profils y compris dans l'extrait du milieu Pois chiche (témoin) (Planche I, Fig I.1, I.2; Fig 9).

Les profils du filtrat de culture Mathur-pectine (MP) montre entre 6 à 10 bandes plus ou moins focalisées. Une bande majeure (Rf 0.37) et deux autres de moindre intensité (Rf 0.27 et 0.75) sont communes pour tous les profils des isolats à l'exception de l'isolat Sig. Le profil de l'isolat TO montre une bande de Rf 0.2 qui n'apparaît pas sur les autres profils. La bande Rf 0.11 apparaît bien focalisée au niveau du profil de l'isolat Sig et faiblement au niveau des autres (Planche I, Fig I.2 ; Fig 10).

**Planche I:**

**Profils des protéines natives de 5 isolats d'*Ascochyta rabiei*; (Culture de 9j).**

**1 : Hatt  
2 : Tess  
3 : AT  
4 : To  
5 : Témoin  
6 : Sig**

**Fig I.1: Protéines de filtrats. Milieu Pois chiche (DPC)**

**1 : Hatt  
2 : Tess  
3 : AT  
4 : To  
5 : Sig**

**Fig I.2: Protéines de filtrat. Milieu Mathur-Pectine.**



**Fig 9. Profils des protéines natives des isolats d'*Ascochyta rabiei* milieu PC**



**Fig 10. Profils des protéines natives des isolats d'*Ascochyta rabiei* milieu MP**

## 4.2- Profils enzymatiques des estérases extracellulaires

La mise en évidence d'un système enzymatique est l'expression d'un nombre réduit de gènes (par rapport aux protéines extracellulaires) et apporte donc une meilleure précision.

Comme pour les protéines, le milieu influence qualitativement les profils des estérases. Le milieu Pectine semble donner moins d'isoenzymes que le milieu Pois chiche. L'activité extracellulaire des estérases sur filtrat du Pois chiche, révèle des profils avec un faible nombre de bandes ; ceci est dû au fait que les estérases restent bloquées dans le gel de concentration. Le nombre d'isoenzymes n'est que de 2 à 3 bandes par profil (Rf 0.17, 0.2 et 0.48). Une bande majeure d'une Rf comprise entre 0.48 et 0.51 est commune à tous les isolats. De même, une autre bande de faible vitesse de migration (Rf 0.17) apparaît sur tous les profils, mais avec une intensité moindre pour les isolats Tess et TO. Une isoenzyme de faible mobilité semble spécifique à l'isolat Sig (Planche II, Fig II .1, Fig 11).

Le nombre de ces isoenzymes sur filtrat Mathur-pectine (MP) varie entre 2 et 4 bandes, dont trois (3) bandes sont communes à tous les profils des isolats. Une bande majeure de Rf variant entre 0.6 et 0.65, est commune à tous les profils y compris pour le profil des estérases du mycélium. Une particularité, le profil de l'isolat Sig présente 2 isoenzymes (Rf 0.2 et 0.24) qui lui semblent spécifiques Planche II, Fig II.2, Fig 12).

**Planche II**

**Zymogrammes d'estérases de 5 isolats d'*Ascochyta rabiei*; (Culture de 9j).**

- 1 : Hatt**
- 2 : Tess**
- 3 : AT**
- 4 : To**
- 5 : Sig**

**Fig II.1: Estérases de filtrat. Milieu Pois chiche (DPC)**

- 1 : Hatt**
- 2 : Temoin**
- 3 : Tess**
- 4 : AT**
- 5 : To**
- 6 : Sig**

**Fig II.2: Estérases de filtrat. Milieu Mathur-Pectine**

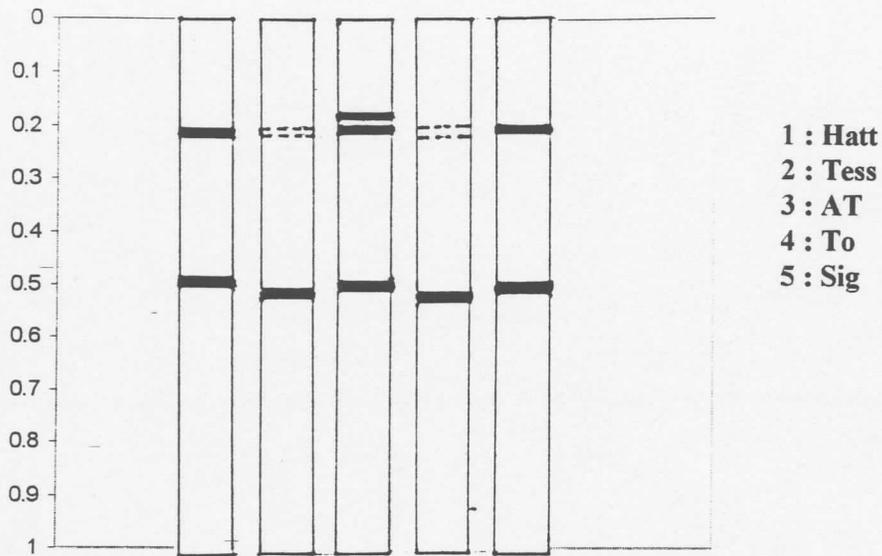


Fig 11. Zymogrammes des estérases extracellulaires des isolats d'*Ascochyta rabiei* sur filtrat de culture du milieu PC.

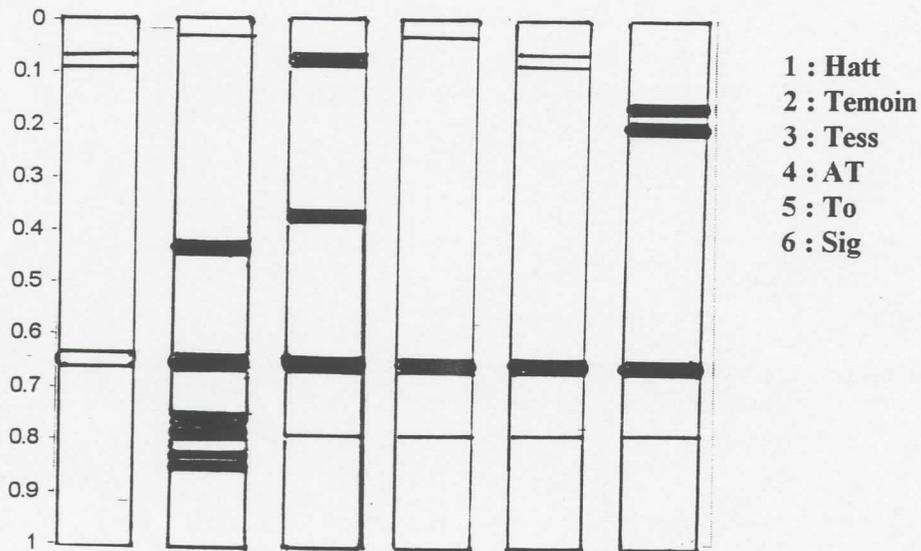


Fig 12. Zymogrammes des estérases extracellulaires des isolats d'*Ascochyta rabiei* sur filtrat de culture du milieu MP.

### 4.3- Détection des isoenzymes dépolymérisantes par isoélectrofocalisation (I.E.F)

L'étude est réalisée sur des filtrats de culture de 9 jours et de 3 jours sur milieu Mathur et Pectine, pour deux isolats d'*Ascochyta rabiei* (Sig) et (Tessala). La séparation des isoenzymes est effectuée en I.E.F, technique à fort pouvoir de résolution, qui permet de mettre en évidence les plus faibles variabilités.

Les zymogrammes des activités polygalacturonate hydrolase (PGH), pectineméthylestérase (PME) et endoglucanases (CMC) réalisés dans cette étude (Planche III, Fig III.1, III.2, III.3) montrent des profils différents selon le milieu et selon l'âge de la culture.

#### 4.3.1- Détection des polygalacturonates hydrolases (PGH)

Les isoenzymes des PGH apparaissent translucides sur fond blanc côté acide. Les bandes de fortes activités sont concentrées autour des pH 5 et 6. Les zymogrammes, pour un même milieu, sont similaires; les activités sont plus élevées sur milieu Pectine. L'échantillon (I) représentant l'isolat (Tessala) sur milieu Mathur âgé de 3 jours, ne montre aucune bande d'activité. Les zymogrammes montrent des bandes d'intensités différentes. Les deux isolats montrent le même profil avec des bandes majeures et des bandes mineures focalisées autour du pH 4 et 6. Sur milieu Pectine, les isolats Sig et Tessala présentent 4 bandes de faible intensité et 4 bandes de forte intensité. Les profils (2) et (4) représentent les isoenzymes produites sur milieu Mathur et montrent 4 bandes de faible intensité se focalisant autour du pH 4 et 6 (Fig 13).

#### 4.3.2- Détection des pectinéméthylestérases (PME)

Les zymogrammes des activités pectinéméthylestérase (PME) montrent des bandes rouge foncé sur fond clair. Les pectatehydrolases et les pectinolyases apparaissent translucides sur fond rouge clair. Les pectatehydrolases focalisent côté acide et les pectinolyases (PNL) focalisent côté basique. La représentation diagrammatique des isoenzymes, montre des profils dissemblables avec des bandes bien focalisées et d'autres moins. Le profil (1) présente deux bandes (PGH) côté acide, une bande (PME) assez nette et une bande claire (PNL) côté basique (Fig 14).

Le profil (2) présente deux bandes (PME) et une bande (PNL) côté basique. Le profil (3), côté acide deux bandes (PGH) et une bande non focalisée (PME) de forte activité. Le profil (4) ne montre aucune bande et le profil (V) présente une bande (PGH) côté acide, deux bandes (PME) focalisées et une large bande non focalisée côté basique. Le zymogramme des (PME) montre des profils dissemblables des isolats sur milieu Pectine (III) et (V). Les profils (II) et (I) du même milieu mais d'âge différent suggèrent que les isoenzymes et leur présence sont influencées par l'âge de la culture (Fig 14).

#### 4.3.3- Détection des endoglucanases (CMC)

Les isoenzymes des CMC (Cx), montrent des bandes qui apparaissent translucides sur fond rose. Ces bandes représentent des isoenzymes qui focalisent côté acide. Les fortes activités focalisent autour des pH 4 à 6. Les isoenzymes provenant du milieu Mathur sont nettement focalisées et celles du milieu Pectine non focalisées. Les profils des isolats sont similaires sur le milieu Mathur. Les profils (2) et (4) présentent les isoenzymes du milieu Mathur des isolats et montrent des bandes nettement focalisées et d'autres moins, côté acide et des activités très faibles côté basique. Les profils (3) et (5) montrent des activités non focalisées côté acide et de faibles activités côté basique (Fig 15).

### Planche III

#### Zymogrammes des enzymes dépolymérisantes de deux isolats d'*Ascochyta rabiei*.



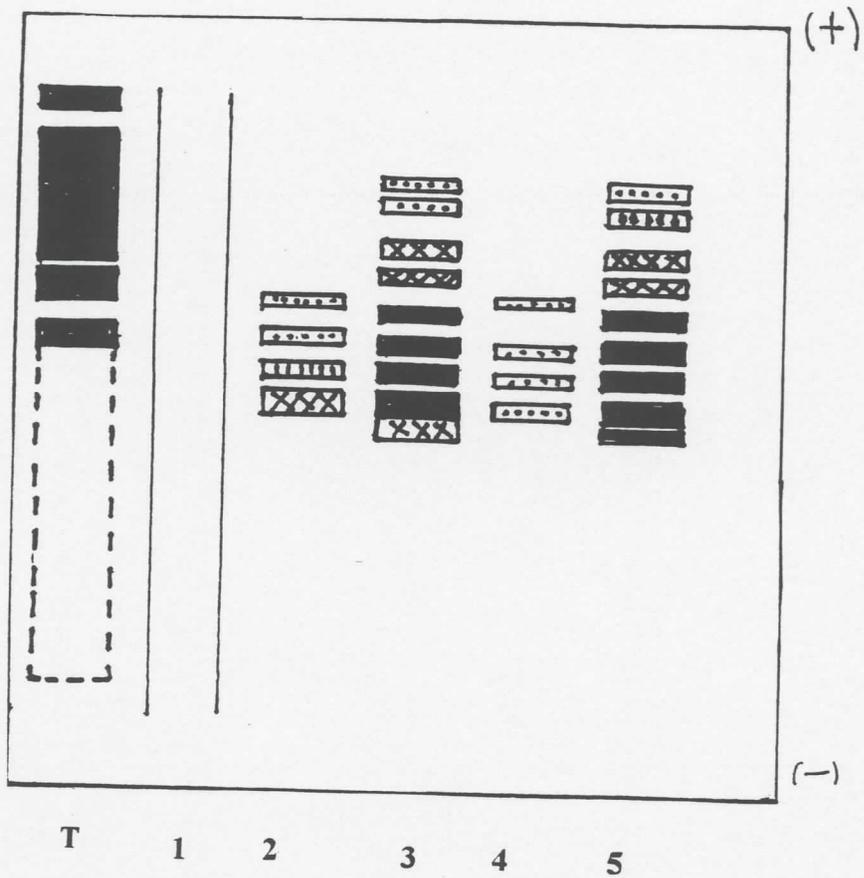
**Fig III.1:** Zymogramme des pectates hydrolases: (PGH)  
**Profil1:** Filtrat de Tess (3j)  
Milieu Mathur  
**Profil2:** Filtrat de Sig  
Milieu Mathur (9j)  
**Profil 3:** Isolat Sig.  
Milieu Pectine (9j)  
**Profil 4:** Isolat Tess.  
Milieu Mathur (9j)  
**Profil 5:** Isolat Tess.  
Milieu Pectine (9j)



**Fig III.2:** Zymogramme des pécynines méthylestérases (PME)  
**Profil1:** Filtrat de Tess (3j)  
Milieu Mathur  
**Profil2:** Filtrat de Sig  
Milieu Mathur (9j)  
**Profil 3:** Isolat Sig.  
Milieu Pectine (9j)  
**Profil 4:** Isolat Tess.  
Milieu Mathur (9j)  
**Profil 5:** Isolat Tess.  
Milieu Pectine (9j)



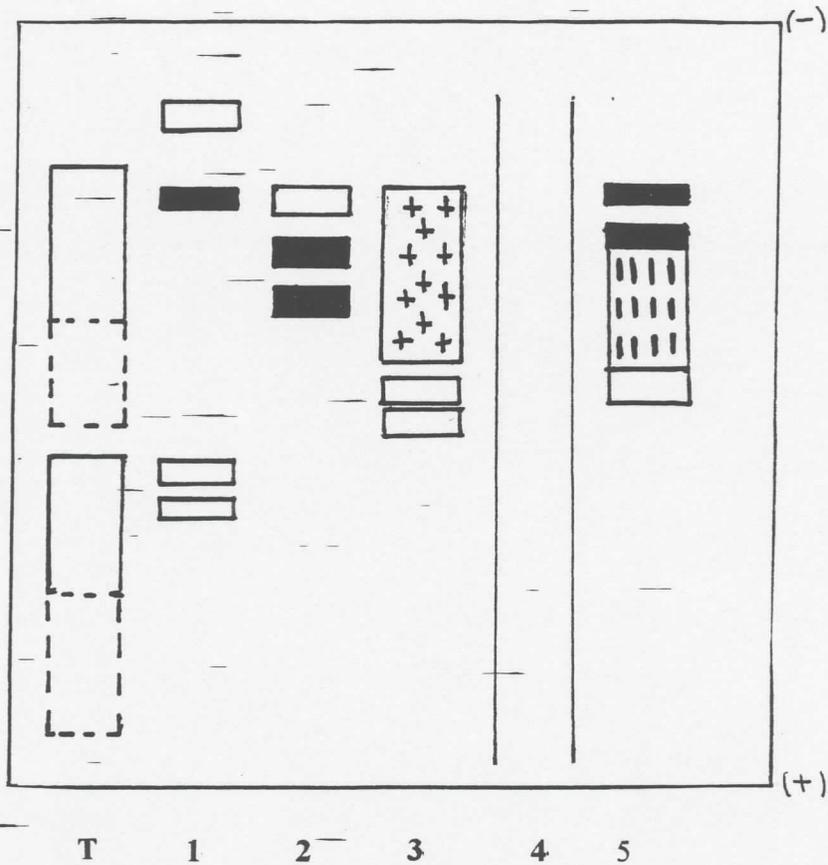
**Fig III.3:** Zymogramme des endoglucanases (CMC)  
**Profil1:** Filtrat de Tess (3j)  
Milieu Mathur  
**Profil2:** Filtrat de Sig  
Milieu Mathur (9j)  
**Profil 3:** Isolat Sig.  
Milieu Pectine (9j)  
**Profil 4:** Isolat Tess.  
Milieu Mathur (9j)  
**Profil 5:** Isolat Tess.  
Milieu Pectine (9j)



**Fig 13:** Zymogramme des activités polygalacturonases (PGH) en IFF de deux isolats de l'espèce *Ascochyta rabiei*, T, Témoin représenté par les pectinases d'*Aspergillus niger*; 1, isolat (Tess) sur milieu Mathur (3èj); 2, isolat (Sig) sur milieu Mathur (9èj); 3, isolat (Sig) sur milieu Pectine (9èj), 4, isolat (Tess) sur milieu Mathur (9èj); 5, isolat (Tess) sur milieu Pectine (9èj).

**Activité enzymatique:**

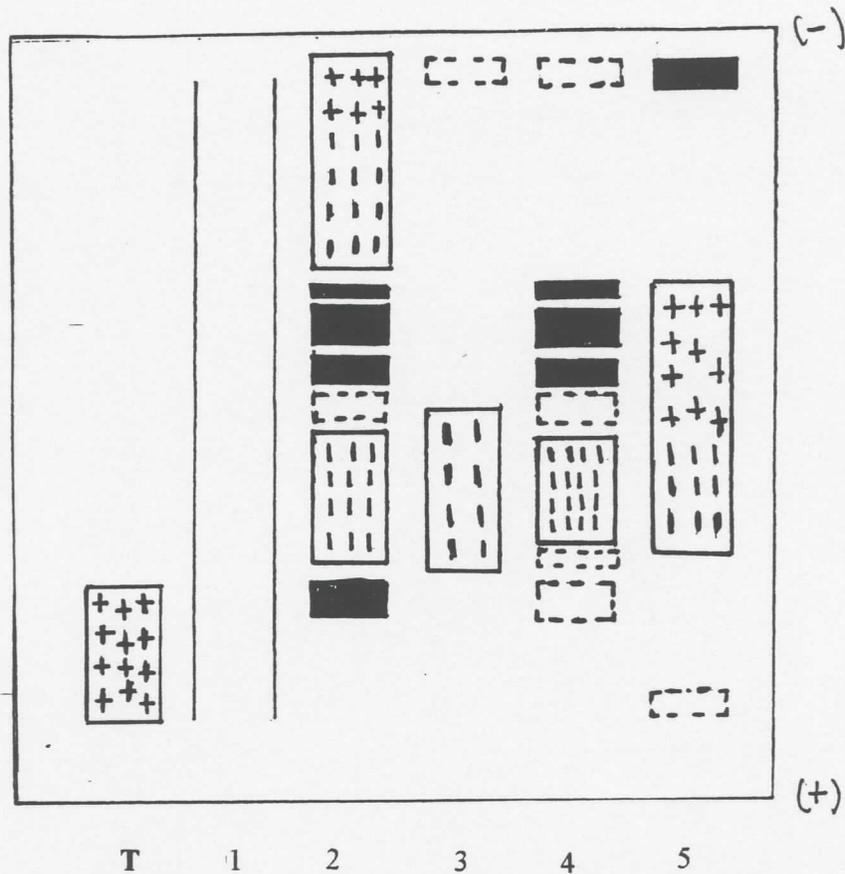
élevée	■
moyenne	▣
faible	▤
très faible	▥



**Fig 14:** Zymogramme des activités pectines méthylestérases (PME) et polygalacturonate hydrolase (PGH) en IEF de deux isolats de l'espèce *Ascochyta rabiei*, t, Témoin représenté par *Aspergillus niger*; 1, isolat (Tess) sur milieu Mathur (3èj); 2, isolat (Sig) sur milieu Mathur (9èj); 3, isolat (Sig) sur milieu Pectine (9èj), 4, isolat (Tess) sur milieu Mathur (9èj); 5, isolat (Tess) sur milieu Pectine (9èj).

**Activité enzymatique:**

- PME- bande focalisée
- ⊕⊕ PME- bande non focalisée de forte activité
- ▤▤ PME- bande non focalisée de faible activité
- PGH ou PNL de forte activité
- ▬▬ PGH ou PNL de faible activité



**Fig 15:** Zymogramme des activités d'endoglucanases (CMC) obtenues en IEF de deux isolats de l'espèce *Ascochyta rabiei*, T, Témoin représenté par *Aspergillus niger*; 1, isolat (Tess) sur milieu Mathur (3èj); 2, isolat (Sig) sur milieu Mathur (9èj); 3, isolat (Sig) sur milieu Pectine (9èj), 4, isolat (Tess) sur milieu Mathur (9èj); 5, isolat (Tess) sur milieu Pectine (9èj).

**Activité enzymatique:**

- activité élevée- bande focalisée
- activité faible- bande focalisée
- ▨ bande non focalisée de faible activité
- ▧ bande non focalisée de forte activité

#### 4.4 Discussion

L'électrophorèse et l'isoélectrofocalisation sont les deux principales techniques qui ont été utilisées pour la caractérisation des protéines chez les champignons.

Le milieu de culture paraît modifier qualitativement et quantitativement les profils protéiques d'*A. rabiei*. Ce type de polymorphisme protéique a été rapporté par **Labdi (1990)**, dans une étude sur les protéines du mycélium d'*A. rabiei*. Contrairement au milieu Pois chiche (PC), le milieu Mathur-pectine (MP) fait apparaître deux profils différents (isolat TO et isolat Sig). Ceci suggère l'existence d'un polymorphisme plus important au niveau des protéines du milieu, mis en évidence sur un substrat inducteur d'activités enzymatiques.

Les profils des estérases extracellulaires peuvent être également influencés par le milieu. En général, les profils des isolats sont semblables à l'exception de l'isolat Sig qui montre des profils différents sur les deux milieux. L'étude des estérases du mycélium pour 18 isolats, a permis de les diviser en trois groupes et sept sous groupes (**Labdi, 1990**). Ce polymorphisme a été confirmé plus tard par **El Biari (1995)** dans son étude sur les isoenzymes du mycélium d'*A. rabiei* en utilisant 13 systèmes enzymatiques.

Ce type d'approche est de plus en plus utilisé pour détecter le polymorphisme entre les isolats d'une même espèce ou d'espèces différentes, et préciser ainsi la taxonomie ou le degré de parenté des isolats.

Dans notre cas, Les zymogrammes obtenus par électrofocalisation, montrent des profils différents selon le milieu de culture et selon l'âge de la culture. L'influence du milieu de culture sur le profil des isoenzymes a été également notée par **Leone et Vandenneuvel, (1987)** dans leur étude sur les souches du *Botrytis cinerea*. Ils affirment que les conditions de culture et autres facteurs liés aux méthodes de détection, peuvent influencer la présence des isozymes. Ainsi, des sources d'azote différentes et les tampons du milieu peuvent influencer la présence et la concentration des PL et PE (**Cruickshank, 1987**).

Les fortes activités révélées sur milieu MP sont probablement des isoenzymes induites par le substrat pectine et sont donc d'origine inductive.

Ces variations ne sont pas propres à *Ascochyta rabiei*, des études sur les zymogrammes des PG, ont déjà montré une variabilité chez des espèces et isolats de nombreux champignons tels que *Sclerotinia spp.*, *Rhizoctonia spp.*, *Penicillium spp.*, *Botrytis spp.* et *Fusarium sp.* (**Leone et Vandenneuvel, 1987**; **Cruickshank, 1983, 1990**; **Neate et al, 1988**; **Scala et al, 1981**).

L'étude des zymogrammes des cellulases (Cx) de *Verticillium albo-trum* n'a pas fait ressortir une variabilité entre les isolats, ou entre leur virulence (**Carder, 1989**).

Quant aux zymogrammes de PGH, ces derniers montrent des profils similaires pour les deux isolats, alors que ceux des PME révèlent des profils différents pour un même milieu (MP) et pour le même âge de culture. Ce résultat laisse supposer l'existence d'un polymorphisme des enzymes hydrolytiques entre les isolats.

La présente étude donne des résultats insuffisants pour pouvoir conclure avec précision, car elle n'a porté que sur deux isolats. Il est nécessaire dans ce type d'étude d'utiliser un plus grand nombre d'isolats, faire beaucoup de zymogrammes pour pouvoir comparer et conclure sur l'existence d'un polymorphisme intraspécifique sur le même milieu et sur différents milieux. Nos résultats nous ont seulement mis sur la voie de la présence d'une variabilité qui doit être précisée ultérieurement.

***CONCLUSION***

## CONCLUSION GENERALE

Cette étude a apporté une autre donnée sur la pathologie d'*Ascochyta rabiei*, à savoir sa capacité à produire, *in vitro* et *in vivo*, des enzymes pectinolytiques et cellulolytiques.

L'étude *in vitro* montre nettement l'influence de la source de carbone sur les activités enzymatiques. Sur les trois milieux différents, les isolats d'*Ascochyta rabiei* produisent des polygalacturonases (PG, PGH), des pectinylases (PL), des pectinéméthylestérases (PME) et des endoglucanases (Cx). Toutes ces enzymes peuvent intervenir dans le pouvoir pathogène au cours du processus d'infection du Pois chiche.

La sécrétion des pectinases et cellulases est variable selon le milieu de culture. L'activité des PL et des PME semble être corrélée avec l'agressivité des isolats, alors que l'activité des PG et des Cx paraît constante ce qui ne nous permet pas de déduire le rôle exact de ces enzymes dans la pathologie.

*Ascochyta rabiei* produit également des PG, PL, PME et des Cx *in vivo*. L'isolat le plus agressif d'*A. rabiei* (Tess) produit des activités enzymatiques supérieures à celles produites par l'isolat d'*A. rabiei* (Sig), faiblement agressif.

En général, les activités révélées par les cultivars sensibles sont plus élevées. Le faible niveau d'activité d'enzymatique révélé au niveau des cultivars résistants, laisse penser que ces sécrétions restent liées aux parois cellulaires, ou sont inhibées par la défense de l'hôte. Ceci suggère la participation de la paroi dans la résistance. Des résultats similaires ont été rapportés par une étude sur les races du *Fusarium oxysporum f. sp. Ciceris* (Peres-Artes et Tena, 1990).

Il ressort de l'étude *in vivo*, une corrélation plus nette entre les activités enzymatiques et l'agressivité des isolats, ce qui n'a pas été le cas pour toutes les activités révélées *in vitro*, notamment celles des PG et Cx. Ce résultat nous permet de supposer que les sécrétions *in vivo* sont contrôlées par le pathogène (agressivité) d'une part et d'autre part par la plante (résistance ou sensibilité).

Notre étude par électrophorèse a permis d'observer un polymorphisme protéique et enzymatique. Les profils obtenus sont nettement influencés qualitativement et quantitativement par les milieux de cultures, c'est-à-dire la source de carbone. D'autres facteurs peuvent interagir sur les résultats, s'ils venaient à être étudiés, tels que la concentration du substrat ou la concentration de l'inoculum (Leone et Heuvel, 1987).

Les isoenzymes hydrolytiques révélées par isoélectrofocalisation sont qualitativement et quantitativement différentes selon le milieu de culture. Elles sont plus actives sur substrat inducteur de pectinases (Mathur-Pectine). Cette étude laisse apparaître au niveau des profils des isozymes des PME, un polymorphisme entre les isolats, mis en évidence dans l'analyse *in vitro*.

Cette étude constitue, à notre avis, la première mise en évidence, par la technique d'électrophorèse, d'enzymes hydrolytiques dans l'interaction Pois chiche - *Ascochyta rabiei*. Ces résultats restent à compléter par des études plus approfondies sur une large gamme d'isolats, telles que :

- une étude *in vivo* utilisant une gamme d'hôtes différentielle avec une analyse des activités enzymatiques à différents stades physiologiques afin de pouvoir déterminer le rôle précis des enzymes hydrolytiques dans la pathologie du champignon,
- une étude des profils des enzymes hydrolytiques sécrétées dans le milieu et dans le végétal,
- une utilisation de différentes techniques de filtration et de traitement des échantillons afin de déterminer leur influence sur la qualité des profils protéiques et enzymatiques.

**REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Agrios, G.N., 1988. Plant Pathology, 4th ed., *Academic Press*, London: 271-272.
2. Ahmed, G.D., Hafiz, A. and Ashraf, M., 1952. Association of morphological characters with blight resistance. In *Proceedings of the fourth Pakistan Science Conference*.
3. Albersheim, P. and Anderson, A.J., 1971. Proteins from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens. *Proceeding of the National Academy of Science (USA)*, 68, 1815-1819.
4. Allam, S.S., Bilton, J.N., Slawin, A.M.Z., Williams, D.J., Sheppard, R.N and Stange, R.N., 1989. Chickpea blight : production of the phytotoxins solanapyrones A and B by *Ascochyta rabiei*. *Phytochemistry*, 28, 2627-2331.
5. Ameziane, E.A., 1981. Modalité d'expression de la résistance d'un cultivar de Pois chiche (*Cicer arietinum*) à *Ascochyta rabiei*, (Pass.) Lab. Thèse de docteur-ingénieur, E.N.S.A., Rennes: 41p.
6. Ameziane, E.A., 1985. L'antracnose du Pois chiche. ICARDA. Amélioration des légumineuses alimentaires, synthèse des travaux du stage de formation, Rabat, 10-16 Feb. 1985, 55-59.
7. Anonyme, 1988. ITCF-UNIP-AFPP-FNAMS-ENSAM-INRA. Le Pois chiche; culture et utilisation, 12p.
8. Arx, J.A., von, 1987. Plant pathogenic Fungi. J. Cramer , Berlin, D, 288p.
9. Auriol, P., 1979. Système d'armes des parasites : les toxines dans les relations hôte-parasite. Bulletin Société botanique, France, 128, *Actualités botaniques*, 4, 97-102.
10. Bateman, D.F., 1966. Hydrolytic and transeliminase degradation of pectic substances by extracellular enzymes of *Fusarium solani* f. *Phabeoli*, *Phytopathology*, 56, 238-244.
11. Bateman, D.F., 1976. Plant cell wall hydrolysis by pathogens. In Friend, F., and D.R. Threlfall (eds), *Biochemical Aspects of plant parasite relationship*, pp. 79-103. *Academic Press*, London.
12. Bateman, D.F and Millar, R.L., 1966. Pectic enzymes in tissue degradation. *Annu. Rev. Phytopat.* 4.
13. Bateman, D.F and Basham, H.G., 1976. Degradation of plant cell walls and membrans by microbial enzymes. (Force by which the pathogen attacks the host plant). Eds. R. Heitefuss et P.H. Williams, *Spinger-Verlag. Physiological Plant Pathology*, 4, 316-355.
14. Bedi, P.S., Aujla, S.S., 1969. Variability in *Phyllostica rabiei* (Pass.) Trot., the incitant of blight disease of gram in the Punjāb. *J. Res. Punjab Agr. Univ.* 6, 103-106.
15. Bertheau, Y., Madgidi-Hervan, E., Kotoujansky, A., Nguyenthe, C., Andro, T., and Coleno, A., 1984. -Detection of depolymerase isoenzymes after Electrophoresis or Electrofocusing or in titration curves. *Analytical Biochemistry* 139, 383-389.
16. Bouznad, Z., 1983. Contribution à la connaissance de quelques aspects biologiques et physio-pathologiques de l'antracnose du Pois chiche causé par *Ascochyta pisi* Lib.. Thèse de Magister, INA Alger. 149p.
17. Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principe of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
18. Bret, E., 1990. L'antracnose du Pois chiche: contribution à la mise au point de techniques de tests de comparaison varietale. Mémoire de maitrise de Bio-physiologie. Univ. D'Angers.

19. Bugbee, W.M., 1990. Purification and characteristics of pectin lyase from *Rhizoctonia solani*. *Physiological and molecular plant pathology*, 36, 15-25.
20. Byrde, R.J.W., 1978. Role of polysaccharide degrading enzymes in microbial pathogenicity. In microbial polysaccharides and polysaccharases. Ed. R.C.W. Berkeley, G.W. Gooday et D.C. Ellwood, pp 417-London New York et San Francisco : *Academic press*.
21. Byrde, R.J.W., 1982. Fungal pectinases: from ribosomes to plant cell wall. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 79 1.
22. Carder, J.H., Hignett, R.C., and Swi, burne, T.H., 1987. Relationship between the virulence of hop isolates of *Verticillium albo-atrum* and their in vitro secretion of cell wall degrading enzymes. *Physiological and molecular plant pathology*, 31, 441-452.
23. Carder, A., 1989. Distinctions between cellulase isoenzyme patterns of five plant-pathogenic *Verticillium* species. *Mycological Research* 92(3) : 297-301.
24. Chen, M.Y. and Strange, R.N., 1991. Synthetis of the solana pyrone phytotoxins by *Ascochyta rabiei* in response to metal cations and development of a defined medium for toxine production. *Plant pathology*. 40, 401-407.
25. Cooper, R.N., 1984. The role of cell wall degrading enzymes in infection and damages. In plant diseases : infection, damage and loss. Ed. R.K.S. Wood, G.J. Jellis, pp 13-27. Oxford : Blackwell.
26. Cruickshank, R.H., 1983. Distinction between *Sclerotinia* species by their pectic zymograms. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 80 (1), 117-119.
27. Cruickshank, R.H and Pitt, J.L., 1987. Identification of species in *Penicillium* subgenus *Penicillium* by enzymes electrophoresis. *Mycologia*, 79 (4), 614-620.
28. Cruickshank, R.H., 1990. Pectic zymograms as criteria in taxonomy of *Rhizoctonia*. *Mycol. Res.* 94 (7),
29. Dhingra, O.D., Schneider, R.W., Sinclair, I.B., 1974. Cellulolytic and pectolytic enzymes associated with virulent and avirulent iselates of macro-phomina *phaseolina* in vitro and in soybean seedlings. *Phytopathologische Zeitschirif* 80, 324-329.
30. Djaoui, A., 1985. Etude de l'antracnose du Pois chiche: pouvoir pathogène et comportement variétal vis-à-vis de quelques souches d'*Ascochyta rabiei*. Mémoire d'Ingénieur Agronome, Alger, 53p.
31. Djellali, M., 1988. Etude en plein champ de la résistance du Pois chiche à l'antracnose. Mémoire d'Ingénieur. INA, El-Harech, 47p.
32. Deysson, G., 1979. Organisation et classification des plantes vasculaires. Tome II. Systématique. Ed. Sedes.
33. El Biari, A., 1995. Etude de l'antracnose du Pois chiche due à *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab : Polymorphisme des populations et diagnostic immuno-enzymatique. Thèse de Doctorat. Université de Paris Sud. 100p.
34. Gowen, S.R., Orton, M., Thurley, B and White, A., 1989. Variation in pathogenicity of *Ascochyta rabiei* on chickpea. *Trop. Pest Manage.* 35, 180-186.
35. Hafiz, A., 1952. Basis of resistance in gram to *Mycosphaerella* blight. *Phytopathology*, 42, 422-443.

36. Hames, B.D., and Rickwood, D., 1987. Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. IRL Press Oxford, England, 7th Edition, 290p.
37. Hamidullah, and Wiese., 1991. Virulence forms of *Ascochyta rabiei* affecting chickpeas. *Agricoltura mediterranea* (Pisa) vol 119(2), 148-151.
38. Hancock, J.G., 1976. Multiple forms of endopectate lyase formed in culture and in infected squash hypocotyls by *Hypomyces solani* f. sp. *Cucurbitae*. *Phytopathology* 66, 40-45.
39. Hohl, B., Arnemann, M., Schwenen, L., Stockl, D., Bringmann, G., Jansen, J., and Barz, W., 1989. Degradation of the pterocarpan phytoalexin (-)-Maackiain by *Ascochyta rabiei*. *Z. Naturforsch.* 44c, 771-776.
40. Karr, A.L., and Albersheim, B., 1970. Polysaccharide degrading enzymes are unable to attack plant cell walls without prior action by a « wall modifying enzyme ». *Plant Physiol.* 46, 69-80.
41. Labdi, M., 1990. Contribution à l'étude de la variabilité d'isolats d'*Ascochyta rabiei*, agent de l'antracnose du Pois chiche en Algérie. Mémoire de D.A.A de phytotechnie. INRA, Versailles. 36p.
42. Labdi, M., 1995. Etude de la résistance à l'antracnose (*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab) chez le Pois chiche (*Cicer arietinum* L.) Thèse de Doctorat de l'ENSA Montpellier. 155p.
43. Latif, Z., Strange, R.N., Bilton, J and Riazuddin, S., 1993. Production of phytotoxins, solanapyrones A and C and cytochalasin D among nine isolats of *Ascochyta rabiei*. *Plant pathology* 42, 172-180.
44. Lehninger, A., 1985. Principe de biochimie. Flammarion Medecine Sciences. Paris, 981p.
45. Leone, G., and Vanden Heuvel, J., 1987. Regulation by carbohydrates of the sequential *in vitro* production of pectic enzymes by *Botrytis cinerea*. *Can.J. Bot.* 65: 2133-2141.
46. Lisker, N., Katan, J., and Henin, Y., 1975. Sequential production of polygalacturonase, cellulase and pectinlyase by *Rhizoctonia solani*. *Canadian Journal of Microbiology.* 21, 1298-1304.
47. Marais, J.P., Dewit, J.L., and Quickie, G.V., 1966. A critical examination of the Nelson-Somogyi method for the determination of reducing sugars. *Anal. Biochem.* 15, 373-381.
48. Marciano, P., Dilema, P., and Margo, P., 1982. Polygalacturonase isoenzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum* *in vivo* and *in vitro*. *Physiological plant pathology.* 20, 201-212.
49. Markert, C.L., 1968. The molecular basis of isozymes. *Annals New York Academy Sci.*, 151, 14-40.
50. Mathur, R.S., Barnett, H.L., Virgil, G.L., 1950. Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. *Phytopathology*, 53, 929-931.
51. Merchant, N.M., 1984. *Ascochyta* blight resistance chickpeas. Proceedings of a training course 3-10 March 1984, NARC, Islamabad, Pakistan. 10-16.
52. Micales, J.A., Bonde, M.M and Peterson, G.L., 1986. The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics. *Mycotaxon*, 27, 405-449.
53. Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry.* 31, 426-428.

54. Mohammed Bashir, I., 1984. Slow blighting a resistance mechanism that needs to be explored if it exists in chickpea germplasm. Proceeding of a training course 3, 10 March 1984, NARC, Islamabad, Pakistan. ICARDA, Aleppo, 47-49.
55. Mussell, H.W., and Green, R.J., 1970. Host colonization and polygalacturonase production by two tracheomycotic fungi. *Phytopathology*, 60, 192-195.
56. Mussell, H., and Strand, L.L., 1977. Pectic enzymes: Involvement in pathogenesis and possible relevance to tolerance and specificity. In: Solheim, B., and Raa, J., (eds), Cell wall biochemistry related to specificity in host-plant pathogen interactions, 31-70, Universitetsforlaget, Oslo.
57. Nasraoui, B., Mlaiki, A., et Abidi, A., 1987. L'anthracnose du Pois chiche en Tunisie: quelques aspects biologiques de son agent causal *Ascochyta rabiei* (Pass.) La. Annales INRA de Tunisie, 60(6), 28p.
58. Neate, S., Cruickshank, R.H., and Rovira, A.D., 1988. Pectic enzyme patterns of *Rhizoctonia solani* isolates from agricultural soils in south Australia. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 90(1), 37-42.
59. Nelson, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 375-380.
60. Nene, Y.L., and Reddy, M.V., 1987. Chickpea diseases and their control. In the chickpea. Saxena, M.C., and Singh, K.B., eds. Wallingford, Oxfordshire, UK, 233-270.
61. Nguyen-The, C., Bertheau, Y and Coleno, A., 1984. Etudes des isoenzymes de polygalacturonases, d'endoglucanases de *Rhizopus spp.* et *Mucor spp.* et différenciation d'isolats dans le sud-est de la France. *Can. J. Bot.* 62: 2670-2676.
62. Olutiola, P.O., 1982. Extracellular polygalacturonase enzyme complex from *Penicillium citrinum* thom associated with internal mouldiness of cocoa (theobroma cacao) beans. *Acta phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 17, 239-247.
63. Osagie, I.J., and Obuekwe, C.O., 1991. Extracellular hydrolytic enzyme production by pathogenic strains of *Fusarium oxysporum f. Sp. elaeidis*. *Mycol. Res.* 95(1), 116-122.
64. Pérez-Artés, E., and Tena, M., 1989. Pectic enzymes from two races of *Fusarium oxysporum f. Sp. Ciceri*. Enzyme production in culture and enzymatic activity on isolated chickpea cell walls. *J. Phytopathology*, 124, 39-52.
65. Pérez-Artés, E., and Tena, M., 1990. Purification and characterisation of pectic enzymes from two races *Fusarium oxysporum f. Sp. Ciceri* differing in virulence to chickpea (*cicer arietinum L.*). *Physiological and molecular plant pathology*, 37, 107-124.
66. Pieters, R., et Tahiri, A., 1986. Breeding chickpea for horizontal resistance to *Ascochyta* blight in Morocco. *FAO Plant. Prot. Bull.*, 34 (2).
67. Reddy, M.V and Singh, K.B., 1983. Exploitation of hosts resistance in the management of *Ascochyta rabiei* and other diseases of chickpea. Proceeding of the international workshop on Fababeans, Kabuli chickpea and lentis in 1980 s, 16-20.

68. Reddy, M.V., 1984. Ascochyta blight of chickpea. Proceedings of a training course 3-10 March 1984, NARC, Islamabad, Pakistan, ICARDA, Aleppo, Syria, 31-37.
69. Reddy, M.V., and Singh, K.B., 1984. Evaluation of a world collection of chickpea germ plasm accessions for resistance to *Ascochyta* blight. *Plant Diseases*, 68, 900-901.
70. Reddy, M.V and Kabbabeh, S., 1985. Pathogenic variability in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab in Syria and Lebanon. *Phytopathologia mediterranea*, 24, 265-266.
71. Rexova-Benkova, L and Markovic, O., 1976. Adv. *Carbohydrate Chem. Biochem.* 33, 323-285.
72. Ried, J.L., and Collmer, A., 1985. Activity stain for rapid characterization of pectic enzymes in isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels. *Applied and Environmental Microbiology*, Sept. 1985, p. 615-622.
73. Saxena, N.P., 1984. Chickpea, the physiology of tropical fields crops. Edited by Goldsworthy, P.R. and Fisher Jhon Willy, N.M., and sons Ltd, 419-446.
74. Scala, F., Cristinzio, G., Marziano, F., and Noviello, C., 1981. Endopolygalacturonase zymograms of *Fusarium* species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 77(3), 587-591.
75. Sherwood, R.T., 1966. Pectinlyase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani* and other fungi. *Phytopathology* 56, 279-286.
76. Some, A., 1988. Variabilité de la composition en systèmes isoenzymatiques de deux champignons phytopathogènes; *Colletotrichum capsici* (syd.) Buther et Bisby et *Fusarium* spp. Thèse de l'Université de Rennes I, 113p.
77. Strobel, G.A., 1974. Phytotoxins produced by plant parasites. *Annual review Plant Physiology*, 25, 541-566.
78. Tchicha, K., 1991. Etude de deux isolats d'*Ascochyta rabiei* agent de l'antracnose du Pois chiche: recherche des enzymes hydrolytiques et leurs relations avec la virulence. Mémoire de fin d'études d'Ingénieur d'Etat. INES Agro. Blida. 36p.
79. Thibault, J.F., 1980. Les substances pectiques. In Costes. Biochimie appliquée: Les polymères végétaux; polymères pariétaux et alimentaires non azotés, 233-251.
80. Tseng, T.C and Mount, M.S., 1974. Toxicity of endopolygalacturonate trans-eliminase, phosphatidase and protease to potato and cucumber tissue. *Phytopathology* 64, 299-236.
81. Tsuyumu, S., Chatterjee, A.K., 1984. Pectinlyase production in *Erwinia chrysantheni* and other soft-rot *Erwinia* species. *Physiol. Plant pathol.* 24, 291-302.
82. Vir, S., Grewal, J.S., 1974 a. Physiologic specialisation in *Ascochyta rabiei* the causal organism of gram blight. *Indian physiopathol.* 27, 355-360.
83. Vir, S., Grewal, J.S., 1974 b. Changes in phenolic content of gram plant induced by *Ascochyta rabiei* infection. *Indian phytopathology*, 27, 524-526.
84. Vir, S., Grewal, J.S., 1975. Change in catalase activity of gram plant induced by *Ascochyta rabiei* infection. *Indian phytopathology*, 28, 223-225.

85. Weigand, F., Koster, J., Weltzien, H.C., and Barz, W., 1986. Accumulation of phytoalexins and isoflavone glucosides in a resistant and a susceptible cultivar of *cicer arietinum* during infection with *Ascochyta rabiei*. *J. Phytopathology*, 115, 214-221.
86. Wood, R.K.S., 1960. Pectic and cellulolytic enzymes in plant disease. *Annual Review of Plant Physiology*, 299-322.
87. Wood, R.K.S., 1972. The killing of plant cells by soft rot parasites. Page 273-388 in R.K.S. Wood ; A. Ballio and A. Graniti., eds. Phytotoxins in plant disease. *Academic Press*, London, 530p.
88. Yanina, W., 1990. Contribution à l'étude de l'antracnose du Pois chiche. Standardisation des méthodes d'inoculation artificielle et étude du pouvoir pathogène de quelques isolats d'*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. Mémoire Ing. INES. Agro. Blida, 43p.

**ANNEXES**

**Annexe 1: Milieu de culture gélosé**

**Milieu Mathur pH 7**

Peptone	1.75g
Extrait de levure	0.25g
Glucose	2.80g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1.25g
Agar	20g
Eau distillée qsp	1000ml

**Autoclaver 20mn à 120°C**

## Annexe 2: Milieux de culture liquides

### **Milieu Mathur**

Voir annexe 1, (sans Agar).

### **Milieu Diffusât Pois-chiche**

Pois-chiche en grains	80g
Eau distillée qsp	1000ml

Mettre les pois-chiches à tremper une nuit, cuire 2h, filtrer, autoclaver 20mn à 120°C.

### **Milieu Pectine**

Milieu Mathur sans glucose  
0.5% de pectine

Préparer une solution de pectine (100ml). Autoclaver séparément.

Le milieu est ajusté enfin à pH 5.0 avec NaOH 1N.

**Annexe 3: Composition des réactifs ZYM A et ZYM B**

**\* ZYM A**

Tri-hydro-methyl-amino-methane		250g
Acide chlorydrique à 37%		110ml
Lauryl sulfate		100g
Eau distillée	qsp	1000ml

**\* ZYM B**

Fast Blue BB		3.5g
2-methyl-ethanol	qsp	1000ml

**Annexe 4: Solutions tamponnées pour les dosages des enzymes**

**Tampon Glycine -NaOH-0.05M, pH 9; 5; 10; 11**

**Solution A**

Glycine 0.2M= 50ml

**Solution B**

NaOH 0.2N

Volume final= 200ml

**Tampon Acétate -0.1M- pH 4.5; 5; 5.5**

**Solution A**

Acétates de Na 0.2M= 50ml

**Solution B**

Acide citrique 0.2M

Volume final= 100ml

**Tampon Tris-HCl - 0.02M- pH 8**

**0.05M- pH 8.5 et 7.8 \***

**Solution A**

Tris 0.08M= 25ml

et 0.2M = 25ml

**Solution B**

Hcl 0.2M

Volume final= 100ml

**N.B.** les volumes sont ajustés après les pH.

**\* Extractions des enzymes des tissus végétaux.**

**Annexe 5: Mesure des activités d'hydrolase et transéliminase**  
**Méthode de SOMOGYI-NELSON (Nelson, 1944)**  
**selon les recommandations de MARAIS et al (1966)**

**Réactif cuivrique**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — — — — — 14g  
Tartrate de Na et K — — — — — 20g

- Dissoudre dans 350ml d'H<sub>2</sub>O
  - Ajouter NaOH (N) 50ml et 40ml CuSO<sub>4</sub> à 10%
  - Introduire 90g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre, diluer à 500ml
- Ce réactif ne sera utilisé qu'un à deux jours après sa préparation (se conserve deux mois).

**Réactif arséno-molybdique**

Molybdate d'HN<sub>4</sub> — — — — — 25g  
Eau — — — — — 450ml  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> — — — — — 21ml

- Agiter pendant l'addition de chacun des produits. Terminer par l'introduction de Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O: 3g dissoute dans 25ml d'eau.
- Laisser reposer à 33°C pendant 48h avant l'emploi.

Le réactif se conserve pendant environ un an dans un flacon coloré au frais.

Pour l'usage, diluer un volume de réactif dans deux volumes d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5N.

**Réaction:** -Echantillon: -1ml de mixture à doser

-Réactif cuivrique 0.5ml (pour stopper la réaction)

- Chauffer au bain-marie 20mn
  - Refroidir
  - Ajouter 2ml ou 1ml de réactif arséno-molybdique
  - Dissoudre en agitant
  - Transférer dans un volume de 50ml puis ajuster.
- Une coloration bleu se développe 1.5 à 2h après.  
La lecture est faite à 750nm.

## **Annexe 6: Dosage protéique par la coloration de BRADFORD**

### **Produits**

50mg de bleu brillant de Coomassie G 250  
25ml d'éthanol à 95%  
85ml d'acide phosphorique (50% w/v)  
qsp 500ml d'eau distillée

### **Protocole**

- Mettre dans un flacon de 50ml, 50mg de bleu, ajouter 25ml d'alcool, mettre à agiter. Mesurer 85ml d'acide.
- Dans une fiole jaugée, mettre: -la solution de bleu  
- l'acide
- Compléter avec l'eau et mettre à agiter au moins 15mn
- Filter sous vide
- Garder dans un flacon noir au frigo (se conserve un mois)

### **Mode opératoire**

- Faire une gamme étalon à partir d'une solution mère de BSA (bovine serum albumine).
- Mettre 400ml de solution à doser, ajouter 4ml de réactif, mélanger.
- La lecture se fait à 535nm, 2 à 20mn après addition du réactif au spectrophotomètre.

**Annexe 7: Tampons d'échantillons**

**Solution « marqueur » d'échantillon (PAGE)**

Glycérol 5ml

Bleu de bromophénol à 1% 1ml

Eau distillée qsp 10ml

Conserver au congélateur en aliquots de 0.5ml.

## Annexe 8: Solutions-mères pour électrophorèse

### **Acrylamide-bisacrylamide**

Acrylamide	—	30g
Bisacrylamide	—	0.8g
Eau distillée	qsp	100ml

Filtrer sous hotte et conserver à 4°C à l'abri de la lumière.

### **Tampon pour gel de séparation (tris-HCl 1.5M-pH 8.8)**

Tris	—	36.3g
Eau distillée	—	100ml
Ajuster le pH à 8.8 avec Hcl 1M environ	—	24ml
Eau distillée	qsp	200ml

Filtrer et conserver à 4°C.

### **Tampon pour gel de concentration (tris-HCl 0.5M-pH 6.8)**

Tris	—	3g
Eau distillée	—	20ml
Ajuster le pH à 6.8 avec Hcl 1M environ	—	24ml
Eau distillée	qsp	50ml

Filtrer et conserver à 4°C.

### **Solution de persulfate d'ammonium à 10%**

Persulfate	—	50mg
Eau distillée	—	0.5ml

A préparer au moment de l'emploi.

### **Tampon de migration pour système PAGE**

**(Tris 0.25M - Glycine 1.92M - pH 8.3)**

**Solution concentrée 10 fois**

Tris	—	30.3g
Glycine	—	144g
Eau distillée	qsp	1000ml

Conserver à 4°C.

**Annexe 9: Préparation des gels en système PAGE**

<b>Solutions mères</b>	<b>Gel de concentration 4% acry</b>	<b>Gel de séparation 7.5% acry</b>
Acrylamide-bisacrylamide (30; 0.8)	1.34ml	5ml
Tampon pour gel de concentration	2.5ml	-
Tampon pour gel de séparation	-	5ml
Eau distillée	6.1ml	9.9ml

Dégazer les solutions jusqu'à la disparition complète des bulles d'air.

Persulfate à 10%	67 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Temed	7 $\mu$ l	10 $\mu$ l

Les volumes sont calculés pour 4 gels de la mini-cuve Hoefer.

**Annexe 10: Révélation des protéines au bleu de Coomassie**  
**(protocole LKB 324 modifié)**

**Solution de fixation**

Acide trichloracétique		200ml
Eau permutée	qsp	1000ml

**Solution de coloration à 0.115%**

Bleu de Coomassie R 250		1.15g
Ethanol		250ml
Acide acétique		40ml
Eau permutée	qsp	1000ml

Agiter pendant 30mn environ jusqu'à dissolution complète, puis filtrer sur papier Whatman n°1.

**Solution de décoloration**

Ethanol		250ml
Acide acétique		20ml
Eau permutée	qsp	1000ml

**Solution de conservation**

Acide acétique		70ml
Eau permutée	qsp	1000ml

**Mode opératoire**

Le gel est immergé, après électrophorèse dans la solution de fixation pendant 30mn, puis rincer 5mn dans la solution de décoloration. Le gel est mis à colorer pendant 1h30 à 2h sur agitateur rotatif, puis décoloré par trempages successifs dans 3 à 4 bains de la solution de décoloration avec un changement de bain toutes les 1 à 2h. Le gel est immergé dans la solution de conservation pendant une nuit, puis séchée à l'air entre deux feuilles de cellophane préalablement imbibées de solution de conservation.

## Annexe 11: Révélation des estérases

### Tampon-phosphate 0.1M pH 6.0

#### Solution A:

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	15,6g
(ou NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O)	28.8g
Eau permutée	qsp 1000ml

Ajuster à pH 6 avec NaOH 1M.

#### Solution B:

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	53.65g
(ou NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O)	40.16g
Eau permutée	qsp 1000ml

Ajuster à pH 6 avec HCl 1M.

#### Solution de colorant

Tampon phosphate	25ml (22ml de A + 3ml de B)
Fast blue RR salt	25mg

Dissoudre le colorant à l'obscurité, puis filtrer la solution.

#### Solution de substrats

Acétone	0.5ml
Alpha-naphtyl-acétate	10mg
Béta-naphtyl-acétate	10mg
Alpha-naphtyl-propionate	10mg

A dissoudre au moment de l'emploi.

#### Mode opératoire

Le gel est immergé, après électrophorèse, dans la solution de colorant, additionnée de la solution de substrat. Le gel est mis à incuber à 37°C, à l'obscurité pendant 20 à 30mn. Les bandes d'activité apparaissent en vert foncé, rose ou brun. Le gel est conservé puis séché selon le protocole décrit en annexe 7.

**Annexe 12: Préparation du gel ultra mince**  
**(0.5mm)(Electrofocalisation)**

Acryl-bis	6.6 ml
Pharmalyte	2 ml
Eau bidistillée dégazée	9.34 ml
Dégazer	
Persulfate à 0.75%	<u>2 ml</u>
	20ml

**Annexe 13: Solutions tampon pour la révélation des enzymes sur gel**

**Tampon Tris-maléate 0.1M pH 5**

**Solution A:**

Tris + acide maléique (0.2M) 50ml

**Solution B:**

NaOH 0.2M  
Volume final 100ml

**Tampon citrate-phosphate 0.05M pH 6.5**

**Solution A:**

Phosphate dissodique ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 12 \text{H}_2\text{O}$ ) 0.1M 50ml

**Solution B:**

Acide citrique 0.2M  
Volume final 100ml

**Tampon citrate NaOH (citrate II Sorensen) 0.1M - pH 5**

**Solution A:**

Citrate dissodique 0.1M (dissoudre 21g d'acide citrique [1  $\text{H}_2\text{O}$ ] dans 200ml d'NaOH 1N et ajuster à 1l)

**Solution B:**

NaOH 0.1N  
Prendre xml de A + (100 - x)ml de B. L'opération se fait au pH-mètre.