

République Algérienne Démocratique et Populaire
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
قرازو التعليم العالي اولبحث العلمي
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie- El-Harrach - Alger

Thèse
en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences
Agronomiques

**Etude de la tache bronzée du blé en Algérie : Identification des
races de l'agent causal *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs
et diversité génétique**

Soutenue par : Hamida Benslimane

Devant le jury composé de :

Pr. Khelifi L.	E. N.S.A - El-Harrach(Alger)	Président
Pr. Bouznad Z.	E. N.S.A. - El-Harrach(Alger)	Directeur de thèse
Pr. Sabaou	E.N.S.-Kouba (Alger)	Examineur
Dr. Louanchi M.	E. N.S.A - El-Harrach (Alger)	Examinatrice
Dr. Benchabane M.	Université de Blida	Examineur
Dr. Benbelkacem A.	INRAA.(Constantine)	Examineur

Année Universitaire 2011-20112

Avant propos

Je rends grâce au Seigneur qui m'a permis d'accomplir ce travail et qui m'a redonné courage et patience pour l'achever.

Je ne saurai sans doute trouver les mots, car ils n'existent pas dans le langage commun des mortels pour exprimer l'hommage que je souhaiterai rendre à mes chers défunts parents. Ils ont été les meilleurs exemples que l'on puisse espérer avoir dans une vie ; ils resteront deux monuments sans égaux dans notre mémoire et nos cœurs.

Que le Divin leur accorde le meilleur là où ils sont car ils ont donné le meilleur à tous ceux qu'ils ont côtoyé dans ce bas monde.

Je dédie aussi ce travail à ceux que je considère comme mon héritage dont la valeur restera à jamais inestimable, ma famille ; mon cher frère et mes adorables sœurs.

Leur soutien moral, affectif et matériel durant toutes ces longues années ne m'a jamais fait défaut.

Je le dédie également à tous les autres membres de ma famille et à mes amis.

Hamida

Remerciements

Avant d'entreprendre l'exposé de ces travaux, je tiens à exprimer mes vifs remerciements à mon Directeur de thèse Pr. Bouznad Z., Professeur de Phytopathologie à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie d'El-Harrach (Alger), pour avoir accepté de diriger cette thèse et pour sa compréhension durant des moments difficiles. Je lui adresse mes vifs remerciements pour sa confiance qui ne m'a jamais fait défaut. Qu'il me soit permis de lui exprimer mon respect et ma profonde gratitude.

De même que je tiens à exprimer ma gratitude à feu Dr. Lamari L. Professeur de Phytopathologie à l'Université du Manitoba (Canada), qui a co-dirigé cette thèse durant une période de sa réalisation pour les conditions idéales de travail qu'il a mis à ma disposition. Je lui rends hommage pour le travail magnifique qu'il a réalisé durant sa carrière sur la thématique du tan spot .

Mes vifs remerciements et mon profond respect vont également au Pr. Khelifi L., Professeur de Biotechnologie à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie d'El-Harrach (Alger), pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury.

Je tiens également à exprimer mes sincères remerciements et ma profonde gratitude ainsi que mes respects aux membres du jury qui ont accepté de donner de leur temps pour examiner ce travail :

Dr. Louanchi M., Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie d'El-Harrach.

Pr. Sabaou ., Professeur de Microbiologie à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba (Alger)

Dr. Benbelkacem K., Maître de Recherche à l'Institut Nationale de la Recherche Agronomique.

Dr. Benchabane M., Maître de Conférences à l'Université (Blida).

Le présent travail n'a pu aboutir que grâce à l'intervention et à la participation de plusieurs institutions Nationales et Internationales et à travers ces dernières un groupe de personnes dont le seul intérêt a été de prêter main forte pour faire aboutir cette recherche et faire avancer la science. Je ne peux donc, entamer cette thèse sans exprimer ma gratitude éternelle à tous ceux qui de prêt ou de loin, ont fait aboutir ce travail. Dans un ordre chronologique d'intervention :

Toutes les personnes qui ont apporté leur précieuse aide lors des prospections, sans celle-ci, rien n'aurait pu être. Je remercie tous ceux qui m'ont intégré « clandestinement » aux prospections de leur institutions, ceux qui m'ont informé, ont repéré, accompagné, conduit à ma place lorsqu'ils jugeaient que la route devenait dangereuse, servis de « garde du corps » ou encore indiqué mon chemin. Parmi beaucoup d'autres je ne peux omettre l'aide et l'appui sans failles de Mme Chahbar N., Chargée de cours au Département de Biologie, Université de Boumerdès. Nora, un grand Merci, j'espère que tu ne garderas de nos mésaventures dans la région de Djendel que la beauté des paysages et le déjeuner au restaurant alors que nous étions encore chaussées de nos bottes de terrain !!

Dr. Benbelkacem A. Maître de Recherche à l'INRA et Dr. Sayoud R. expert au près de SYNGENTA pour m'avoir fait bénéficier de leur expérience du terrain lors des prospections des régions de l'Est. De même que j'exprime ma gratitude à Mme Ramla D. Chargée de Recherches à l'INRA pour m'avoir intégré dans son équipe lors des prospections des régions de Blida et Boumerdès.

Mr. Zghida Directeur de l'Institut des Grande Culture pour m'avoir tant facilité l'accès à l'I.T.G.C. et plus particulièrement au laboratoire de Phytopathologie. A travers ces lignes je lui exprime toute ma gratitude pour sa compréhension et sa considération des exigences d'une expérimentation qui a été souvent « capricieuse ». Grace à lui, le laboratoire a toujours été ouvert pour moi à toute heure et à tout moment de la semaine.

Mmes Aouali S. et Khalfi A., du Laboratoire de Phytopathologie de l'I.T.G.C. où j'ai réalisé la totalité de mes isollements. Je leur exprime ma gratitude pour m'avoir fournie plusieurs échantillons de blé présentant les symptômes recherchés. Souhila et Assia toute en conservant un professionnalisme exemplaire vous n'avez jamais fait défaut à l'amitié qui nous a toujours réunie, merci infiniment.

Mlle Grieger A., Technicienne au Laboratoire de Phytopathologie (Department of Plant Science) de l'Université du Manitoba (Canada), à qui j'exprime toute ma gratitude pour m'avoir tant appris sur la culture et la conservation de ce champignon, ainsi que pour son aide lorsque j'ai repris les travaux de cette thèse en Belgique et en Syrie. Ardelle, our friendship will be still a beautiful memory forever.

Dr. Ballance M., pour m'avoir accepté au sein de son Laboratoire de Biologie Moléculaire (Department of Plant Science) de l'Université du Manitoba (Canada). Je remercie également Mr. Kowatsch R., Technicien au sein du même laboratoire pour ses conseils lors de la réalisation de mes manipulations.

Pr. Kesri R. Professeur de chimie à l'Université des Science et des Technologies de Bab-Ezouar et ancienne Rectrice de l'Université M'hamed Bougar de Boumerdès (UMBB). Je lui exprime toute ma reconnaissance et ma gratitude et mon plus profond respect pour la formation dont j'ai bénéficié dans le cadre du projet « création du pôle de compétences en Biologie Moléculaire et Biotechnologie à l'Université de Boumerdès ». Cette formation qui m'a fortement été bénéfique lorsque l'approche moléculaire et parfois bioinformatique a été entreprise durant mes travaux. Merci MADAME d'avoir crue en nous, jeunes enseignants que nous étions en arrivant à l'UMBB, éternels étudiants que nous resterons.

Dr. Legrève A. de l'Unité de Phytopathologie, Université Catholique de Louvain (Louvain la neuve, Belgique) où la caractérisation moléculaire des isolats ayant montré un nouveau profil de virulence a été initié. Je lui exprime ma gratitude pour m'avoir accepté dans son laboratoire et pour avoir financé les manipulations réalisées.

Pr. Jacobs P. et Dr. Ginis D. de l'Université Libre de Bruxelles pour avoir assuré le financement de mon déplacement et de mon séjour en Belgique lors des travaux réalisés à l'Université Catholique de Louvain. Je leur exprime à travers ces lignes toute ma gratitude ; Paul et Dimitri , un grand merci pour la « gymnastique » que vous avez réalisé sur les budgets de la C.U.D. (Commission Universitaire au Développement).

Dr. Baum M. Directeur du « Biodiversity and Integrated Gene Management Program », ICARDA (Syrie) et Dr. Yahyiaoui A. Chercheur principal dans le « Global Wheat Program », CIMMYT (Mexique) grâce à qui j'ai pu obtenir de l'ICARDA, le financement qui a assuré en partie mon séjour en Syrie et la totalité des dépenses de recherches nécessaires pour l'étude de la diversité génétique des isolats. Micheal, thank you very much to offer me the opportunity to conduct my last Phd research part at ICARDA, and provide me all facilities and free related research material. You have contributed too much to make my Phd thesis succeed. Amar, at least I can tell you, I'm grateful for your assistance, your support and for the time you spent to solve my problems. You have not only contributed to make my thesis succeed but you have contributed to my future plans and career choices.

Dr. Ogbonnaya F. Responsable de l'Unité de Biotechnologies, l'ICARDA (Syrie) pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire de Biologie Moléculaire où l'analyse de la diversité génétique a été réalisé. Thank you Francis so much to accept me in your lab.

Dr. Lababidi S. du laboratoire de Biologie Moléculaire (ICARDA) pour ses conseils techniques lors de la réalisation de mes manipulations. Many thanks Sameer for your technical assistance.

Dr. Hamweih A. Chercheur associé à l'ICARDA pour ses conseils lors de l'analyse de mes résultats. Thank you Alaa to find always a time to answer to all my questions, and thank you so much to share your knowledge.

Dr. Sterlkov S. de l'Université d' Alberta (Canada) pour ses conseils lors de la rédaction de mon premier article. Thank you so much Steeve, because you was always able to find a time to replay to my requites, even you was busy. Thank you so much for your advices.

Dr. Sing P. Chercheur associé au CIMMYT (Mexique) pour ses discussions enrichissantes pendant mon séjour au CYMMIT(Mexique) et qui m'ont énormément servis lors de la rédaction de ma thèse. Many thanks Pawan it was a great pleaser to meet you and to hear to your advices. I'm grateful to you for your help witch followed the publication of my first paper.

Dr. Shaukat A. de North Dacota State University (NDSU) pour m'avoir offert son aide *online*, pour ses conseils et pour m'avoir toujours fourni la littérature que je ne pouvais pas trouver. Again many thanks Ali, even we never met before you were always there.

Dr. Manisha Shankar de "University of Western Australia", Pr. Oliver R. et Dr. Moffat de l' Australian Centre for Necophic Fungal Pathogens", ainsi que Dr. Manning V. de l'Orgon State University, pour leur feedback , suite à la publication de mon premier article, ce retour qui a été un

vrai starter pour la rédaction de cette thèse. It was a real pleasure and an honor to interact with you.

Mes amies Leila, Nora, Djoher, Kenza et Houda dont le soutien et l'affection durant les pires moments de mon existence ne pourra sans doute trouver aucun qualificatif dans le langage commun des mortels. Les filles, si je devais faire l'inventaire de ma fortune, vous occuperez au près de ma famille le sommet de ma liste. Un merci sans égal.

Tous mes autres ami(e)s en Algérie et ailleurs qui m'ont encouragé tant à terminer cette thèse et qui m'ont exprimé leur joie lors de son achèvement ; Lilet , Ali , Houcine et tous les autres (Algérie), Habiba , Ardelle, Adel (Canada), Cyril (Belgique) Nacera et Ralph (USA), Wafaa et Khaled (Tunisie), Sara (Liban, France) , Eloise (France), Rahela et Taha (Iran) , M'hamed et Haitem (Syrie), Nadjib et Hassib (Afganistan), Rihab (Egypte), Sara et Sanna (Maroc). Un grand merci à tous et une pensée affective au groupe multinational que les concerts de musique classique et de Mouachahat, réunissaient le lundi soir de chaque mois au Centre Culturel Arabe à Alep.

Sommaire

I. Introduction.....	1
II. Analyse Bibliographique	5
II.1. La maladie du Tan Spot	6
II.1.1. Symptomatologie	6
II.1.2. Histologie du processus d'infection	6
II.2. L'agent causal de la tache foliaire bronzée	9
II.2.1. Position Taxonomique et caractères morphologiques	9
II.2.2. Gamme d'hôte.....	11
II.2.3. Epidémiologie	11
II.2.4. Variabilité du <i>P. tritici-repentis</i>	12
II.2.4.1. La variabilité pathogénique.....	11
II.2.4.2. Distribution des races de <i>P. tritici-repentis</i> dans le monde.....	13
II.2.4.3. Variabilité génétique de <i>P. tritici-repentis</i>	14
II.2.5. Toxines produites par <i>P. tritici-repentis</i>	16
II.2.5.1. La toxine PtrA.....	17
II.2.5.2. La toxine PtrB.....	18
II.2.5.3. La toxine PtrC.....	19
II.3. La relation du gène pour gène dans l'interaction blé/ <i>P. tritici-repentis</i>	19
II.4. Les moyens de lutte	21
II.4.1. Lutte culturale	21
II.4.2. Lutte chimique	21
II.4.3. Lutte biologique	22
II.4.4. Lutte génétique	23
II.5. Mécanisme de résistance du blé à l'égard du <i>P. tritici-repentis</i>	23
II.6. Méthodes moléculaires utilisées pour la caractérisation des champignons Phytopathogènes.....	24
II.6.1. Analyse des protéines	25
II.6.2. Analyse de l'ADN	25
II.6.2.1. RFPL (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	25
II.6.2.2. RAPD (Random Amplified Polymorphic).....	26
II. 6. 2. 3. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphic).....	26
II. 6. 2. 4. Microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeat)	27
III. Matériels et Méthodes.....	29
III.1. Matériels.....	29
III.1.1. Matériel fongique.....	30
III.1.2. Matériel végétal.....	30

III.2. Méthodes	34
III.2.1. Isolement monospore	34
III.2.2. Repiquage des isolats conservés en solution de glycérol	34
III.2.3. Conservation des isolats	35
III.2.4. Caractérisation morphologique des isolats	35
III.2.4.1. Mensuration des conidies	35
III.2.4.2. Croissance radiale des cultures	35
III.2.5. Détermination des races par inoculation artificielle	36
III.2.5.1. Préparation de l'inoculum	36
III.2.5.2. Inoculation	36
III.2.6. Inoculation de confirmation du nouveau profil de virulence	37
III.2.7. Production au laboratoire du télomorphe <i>P. tritici-repentis</i>	37
III.2.8. Amplification des gènes ToxA et ToxB	38
III.2.8.1. Cultures des isolats en milieu liquide	38
III.2.8.2. Extraction de l'ADN	38
III.2.8.3. Détermination quantitative de l'ADN extrait	39
III.2.8.4. Détermination qualitative de l'ADN extrait	40
III.2.8.5. Mélange réactionnel et cycle d'amplification	40
III.2.8.5.1. Milieu réactionnel	40
III.2.8.5.2. Amorces utilisées	40
III.2.8.5.3. Cycles d'amplification	41
III.2.8.5.4. Révélation des fragments d'ADN amplifiés	41
III.2.9. Caractérisation moléculaire des isolats possédant le nouveau profil de virulence	41
III.2.9.1. Matériel Biologique	45
III. 2.9.2. Extraction de l'ADN	45
III. 2. 9.3. Détermination de la quantité et de la qualité de l'ADN	44
III. 2. 9. 4. Recherche des gènes ToxA, ToxB et <i>tox b</i> par PCR	45
III.2.9.4.1. Mélange réactionnel	46
III.2. 9.4.2. Amorces utilisées	46
III.2.9.4.3. Cycles d'amplification	47
III.2.9.4.4. Révélation des fragments d'ADN amplifiés	47
III.2.9.4.5. Purification des produits d'amplification	47
A) Protocole 1	47
B) Protocole 2	48

III.2.9. 4. 6. Quantification de l'ADN contenu dans les produits d'amplification purifiés.....	48
III. 2. 9. 5. Séquençage des produits d'amplification.....	48
III. 2. 9. 6. Analyse des séquences obtenues	48
III.2.9.6.1. Création d'une base de données pour ToxA et ToxB	49
III.2.9.6.2. Analyse des séquences en utilisant Clustalw.....	49
III. 2. 10. Analyse de la diversité génétique chez <i>P. tritici-repentis</i> par marqueurs AFLP	49
III. 2. 10. 1. Matériel fongique	49
III. 2. 10. 2. Extraction de l'ADN	49
III. 2. 10. 3. Evaluation quantitative et qualitative de l'ADN	51
III. 2. 10. 4. Digestion de l'ADN	51
III. 2. 10. 5. Ligation des produits digérés aux adaptateurs	52
III. 2. 10. 6. Vérification de la qualité des réactions de Digestion-Ligation	52
III. 2. 10. 7. Amplification par PCR.....	52
III.2.10.7.1.Pré-amplification.....	52
III.2.10.7.2. Amplification sélective.....	53
III.2.10.7.3. Analyse des données	57
A. Analyse hiérarchique	58
B. Polymorphism information content (PIC).....	58
IV. Résultats et Discussions	60
IV.1. Prévalence de la tache bronzée du blé et confusion entre les symptômes dans les régions céréalières d'Algérie.....	61
IV.2. Isolement et identification en laboratoire de l'agent pathogène.....	65
IV.3. Caractérisation morphologique des isolats..... ;.....	67
IV.3.1. Mensuration des conidies	67
IV.3. 2. Croissance radiale	72
IV.4. Détermination des races du <i>P. tritici-repentis</i> en Algérie	78
IV.5.Résultats de l'inoculation de confirmation du nouveau profil de virulence	95
IV. 6. Caractérisation du téléomorphe <i>P. tritici-repentis</i>	98
IV.7. Amplification des gènes ToxA et ToxB	100
IV.7 .1. Amplification du gène ToxA.....	101
IV.7.2. Amplification du gène ToxB.....	103

IV.8. Caractérisation moléculaire des isolats possédant les nouveaux profils de virulence	107
IV.9. Analyse de la diversité génétique chez <i>P. tritici-repentis</i> par marqueurs AFLP.....	116
V. Conclusion et Perspectives	128
VI. Références Bibliographiques.....	133
Annexes	

Introduction

Les céréales et leurs dérivées constituent l'alimentation de base dans beaucoup de pays en voie de développement, particulièrement en Afrique du Nord.

En Algérie, ces produits occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale. En effet, La production des céréales (jachère comprise), occupe environ 80% de la superficie agricole utile (SAU) du pays ; la superficie emblavée annuellement en céréales se situe entre 3 et 3,5 million d'ha et les superficies annuellement récoltées représentent 63% des emblavures. Elle apparaît donc comme une spéculation dominante, pratiquée par la majorité des exploitations dans tous les étages bioclimatiques, selon le RGA 2001 (Recensement General de l'agriculture), soit 60% de l'effectif global. En matière d'emploi, et selon le ministère de l'Agriculture, plus de 500 000 emplois permanents et saisonniers sont procurés par le système céréalier (Djermoun, 2009).

Sur le plan nutritionnel, le blé constitue la première ressource en alimentation humaine et la principale source d'hydrates de carbone de plusieurs pays dans le monde. En effet, l'importance des surfaces consacrées à cette culture sur la planète dépasse celle de toutes les autres cultures. En Algérie, les deux espèces de blé (blé dur et blé tendre) sont les plus importantes. Malgré l'aire importante réservée annuellement à ces cultures, la production reste faible, très irrégulière et insuffisante pour couvrir les besoins nationaux en consommation humaine. La satisfaction des besoins en ces céréales, est comblée dans une large mesure par de lourdes importations ; ces dernières se révélant nécessaires pour satisfaire la demande des marchés en produits céréaliers. Une demande alimentée par le niveau de consommation des produits céréaliers qui est évalué autour d'une moyenne annuelle de 220 Kg par habitant. Ce qui positionne l'Algérie, à la 5ème place des pays les plus gros consommateurs de céréales, établi par le Conseil International des Céréales (C.I.C.).

La faible production céréalière est due à plusieurs facteurs dont les plus importants sont les pratiques culturales, les aléas climatiques, l'utilisation de variétés anciennes à faible rendement et l'état phytosanitaire des cultures. En effet, les maladies peuvent représenter un facteur dépressif sur les composantes du rendement et par conséquence sur le rendement final d'une culture.

Ainsi, durant ces dernières années, de nombreuses maladies foliaires, et notamment celles causées par les champignons, sont observées sur les blés et seraient à l'origine d'une diminution des rendements. Les prospections menées par les stations de l'Institut Technique des Grandes Cultures (I.T.G.C.) ont montré que parmi les maladies les plus présentes, la tache bronzée du blé causée par *Pyrenophora tritici-repentis*, est largement distribuée dans les régions céréalières en Algérie (Bendif, 1994).

La tache bronzée (=Tache auréolée, Tan Spot pour les anglo-saxons) causée par *Pyrenophora tritici- repentis* (Died.) Drechs., est une maladie du blé très répandue à travers le monde, qui induit des pertes de rendement au champ pouvant atteindre 49% (Rees et al., 1982). Ceci a suscité l'intérêt de nombreuses équipes de recherche ; durant les années 1970, des travaux de recherche sur cette maladie avaient déjà débuté aux USA et en Australie successivement par Hosford et Rees. Toutefois, la découverte d'une toxine spécifique de l'hôte à la fin des années 1980 a été très décisive pour l'évolution des recherches relatives à ce pathosystème. Depuis, et au cours des trois dernières décennies, de nombreuses études approfondies furent entreprises sur la variabilité physiologique chez le pathogène ainsi que sur les interactions hôte pathogène.

Sur la base des données existantes, nous pouvons dire que les travaux de recherche concernant la tache bronzée du blé sont presque inexistants en Algérie, et ceci malgré l'importance stratégique que représente la culture du blé qui n'est d'ailleurs plus à montrer. Les seuls travaux publiés dans ce sens sont au nombre de deux. Le premier, est celui de Lamari et al. (1995) qui décrit la découverte de la race 5 isolée à partir d'échantillons de blé collectés dans l'Est algérien. Le second travail publié par la même équipe est celui de Strelkov et al. (2002) relatif à la découverte et la description de la race 6, également isolée d'échantillons de blé collectés dans l'Est du pays.

Pourtant les prospections menées par les stations de l'Institut Technique des Grandes Cultures durant les années 1990 à travers les zones céréalières, (seule enquête à ce jour qui a permis de dresser le statut des maladies des céréales en Algérie), font clairement état de la présence de la maladie dans les zones littorales et sub-littorales. Cette même source qualifie la maladie comme étant sévère surtout sur les cultures de blé dur. En revanche, elle reste de sévérité moyenne à faible sur les cultures de blé tendre (Sayoud et Benbelkacem, 1996). Même si nous ne disposons pas de données nationales sur les pertes que les maladies fongiques induiraient sur les cultures, il s'agit là d'un facteur qui peut affecter la production céréalière que l'on ne peut plus négliger. D'autant plus que certains travaux menés dans d'autres pays ont montré que la tache bronzée du blé affectait clairement les composantes du rendement, puisque elle provoque la réduction du tallage, celle du poids des graines, et induit également une diminution de la quantité de matière sèche produite (Ress et Platz, 1983).

La lutte contre cette maladie fongique est souvent axée sur l'utilisation des produits chimiques et des pratiques culturales adéquates. Toutefois l'utilisation de génotypes résistants reste sans doute, le moyen de lutte le plus efficace, le plus économique et le plus respectueux de l'environnement.

Il nous semble donc important d'établir une stratégie de lutte efficace et durable à l'égard de cette maladie, basée sur le développement de génotypes résistants qui seront utilisés selon le déploiement géographique des gènes de virulence et d'avirulence. Toutefois l'amélioration de la résistance génétique des génotypes de blé cultivés n'est possible que si la structure des populations locales de *P. tritici-repentis* est bien connue et que sa diversité largement cernée. Cette démarche nécessite une caractérisation au laboratoire des isolats de *P. tritici-repentis* présents dans les différentes zones céréalières algériennes. Une caractérisation qui doit être réalisée à plusieurs niveaux : morphologique, physiologique, pathologique, biochimique et moléculaire.

C'est donc dans cette large thématique que nous avons entamé l'étude de la tache bronzée du blé en Algérie, nous fixant plus particulièrement deux objectifs principaux ; l'identification des races présentes dans les zones de culture à travers le pays et l'étude de la diversité génétique des populations algériennes de *P. tritici-repentis*.

A cet effet, la réalisation de nos objectifs a nécessité de poursuivre la démarche scientifique suivante :

1. Une prospection des différentes zones céréalières du pays et une collecte d'échantillons de blé dur et de blé tendre présentant les symptômes typiques de la maladie.
2. L'isolement du champignon et la constitution d'une collection d'isolats algériens de *P. tritici-repentis*.
3. La caractérisation morphologique et physiologique d'un ensemble d'isolats.
4. L'identification des différentes races présentes dans le pays et leur répartition respective dans les différentes zones céréalières. Dans ce contexte ; nous avons réalisé aussi bien des inoculations sur une gamme différentielle que des amplifications des gènes de virulence. Cette étape de notre démarche, a généré une étape supplémentaire qui a consisté en la caractérisation pathologique et moléculaire d'un nouveau profil de virulence identifié pour la première fois et encore non connu. Ce dernier nous a permis de proposer l'existence d'une nouvelle race de l'espèce étudiée.
5. L'étude de la diversité génétique des isolats algériens de *P. tritici-repentis* en utilisant la technique fAFLP (Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism).

Analyse Bibliographique

La tache helminthosporienne est une maladie du blé, communément désignée par l'appellation Anglo-saxonne "Tan spot" ; la maladie est également connue sous le nom de maladie de la tache bronzée ou maladie de la tache jaune. C'est une maladie foliaire économiquement importante dans les principales régions productrices de blé dans le monde. Elle induit des pertes qui peuvent atteindre 50% quand la maladie est présente tout au long du cycle de la culture.

II.1. La maladie du Tan spot :

II.1.1. Symptômatologie : Au champ, la maladie s'exprime sur les feuilles par des taches de couleur jaune, brune ou marron, de forme ovale entourées généralement par un halo jaunâtre, le centre de la lésion apparaît de couleur marron foncé (Marshall, 2009) (Fig. 1). Ces taches peuvent s'unir pour former de larges plages jaunâtres (Fig. 2) induisant ainsi la mort des feuilles (Engle *et al.*, 2004).

Sur les jeunes plantules, la maladie progresse du bas vers le haut de la plante suivant sa croissance (Wegulo *et al.*, 2006), et peut infecter les graines durant le stade du remplissage des grains (Schilder et Bergstrom, 1994). Ceci affecte la qualité du grain qui présente une coloration rougeâtre (Fernandez *et al.* 2001), ce symptôme connu sous l'appellation « Red Smudg » (Valder, 1954), est plus observé chez le blé dur (Fernandez *et al.*, 1994a) (Fig. 3). L'infection par *P. tritici-repentis* peut être également à l'origine d'un autre symptôme sur les graines du blé connu sous la nomination de « black point of wheat » (Fernandez *et al.*, 1994b ; Franci et Jordahl , 1992), celui-ci est exprimé par de petits points noirs recouvrant la graine (Fig. 4).

II.1.2. Histologie du processus d'infection : Plusieurs études ont décrit la nature de l'infection et de la colonisation des tissus de blé par *P. tritici-repentis* (Larez *et al.* 1986 ; Loughman et Deverall 1986 ; Lamari et bernier 1989c ; Dushnicky 1993 ; Dushnicky *et al.* 1996,1998).

Larez *et al.* (1986) ont constaté que la plupart des infections se produisent entre 6 et 24h après l'inoculation. Chaque conidie germe pour produire plusieurs tubes germinatifs, qui forment des appressoria au-dessus des cellules épidermiques ou stomatiques. Un hyphes de pénétration développé à partir de l'appressorium, pénètre la cellule épidermique par voie mécanique et enzymatique et forme à l'intérieur de la cellule épidermique une vésicule. A partir de cette dernière, le pathogène croît entre les couches du mésophile en suivant les espaces intercellulaires. Aucune pénétration des cellules du mésophile n'est observée (Lamari et Bernier, 1989c) (Fig. 5). La destruction des organites



Figure 1 : Symptôme typique du Tan Spot observé sur les champs infectés, selon McMullen (2003)



Figure 2 : Union des lésions sur un limbe foliaire selon McMullen (2003)



Figure 3 : Symptôme du « red smudge » sur les graines de blé selon McMullen (2003)



Figure 4 : Symptôme du « black point » sur les graines de blé selon DeWolf (2008)

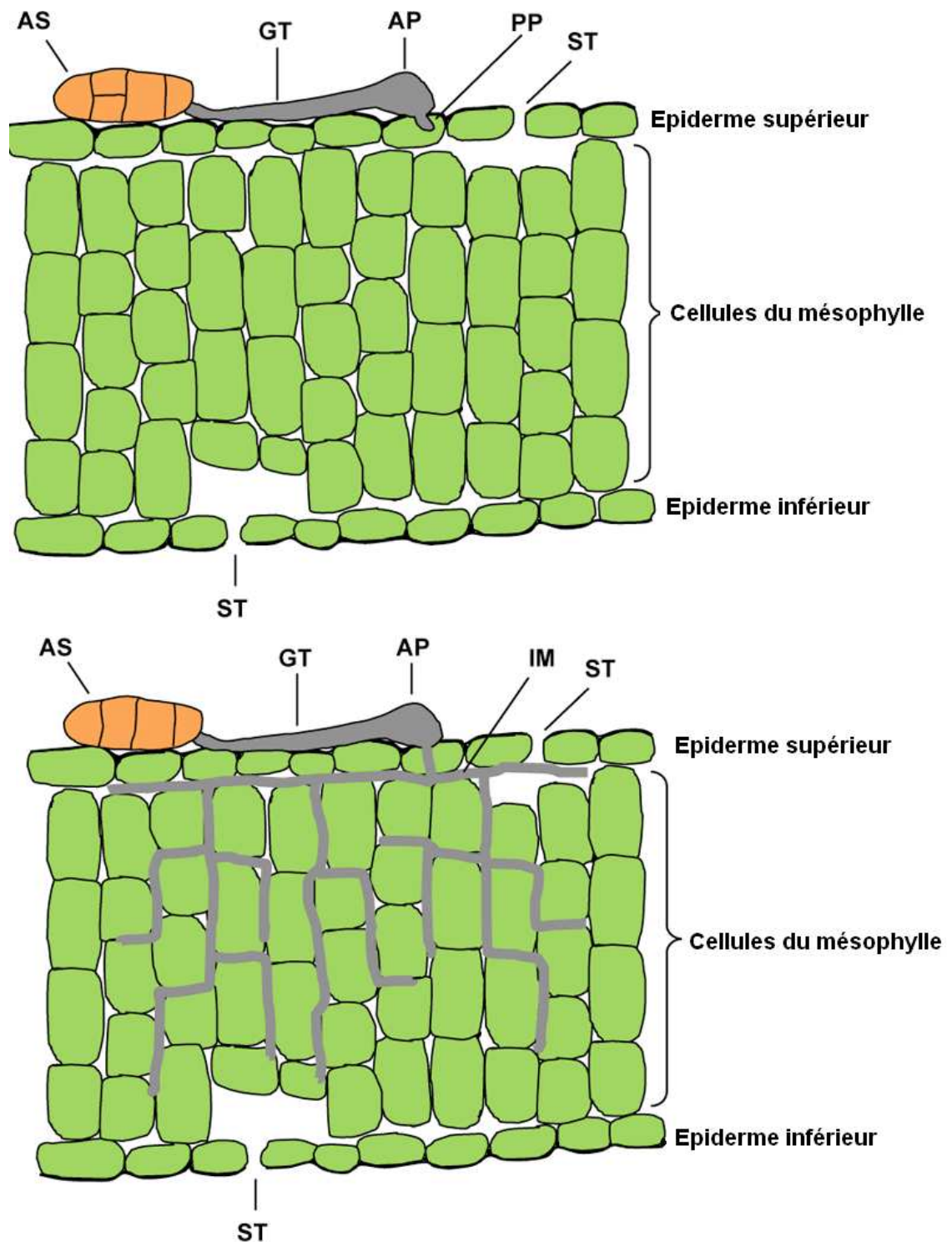


Figure 5 : Schéma d'une section transversale dans une feuille de blé illustrant le processus d'infection (Anonyme 2011).

(AS) une ascospore en germination. (GT) Tube germinatif. (AP) Appressorium. (PP) Hyphe de pénétration. (ST) Stomates. (ST) le phénomène peut se produire aussi bien au niveau de la surface foliaire supérieure qu'inférieure. (IM) Mycélium à développement intercellulaire.

cellulaires est alors observée, au-delà de la région du développement du champignon en raison de la diffusion de phytotoxines (Lamari *et al.*, 1995).

Le processus d'infection de la graine par *P. tritici-repentis* est très semblable à celui observé au niveau de la feuille. En effet, un hyphes fongique produit un appressorium et pénètre l'épiderme de la graine. Par la suite, le champignon colonise les couches hypodermiques et celles du péricarpe, enfin il se localise le plus souvent au niveau de la brosse et de l'embryon (Schilder, 1993)

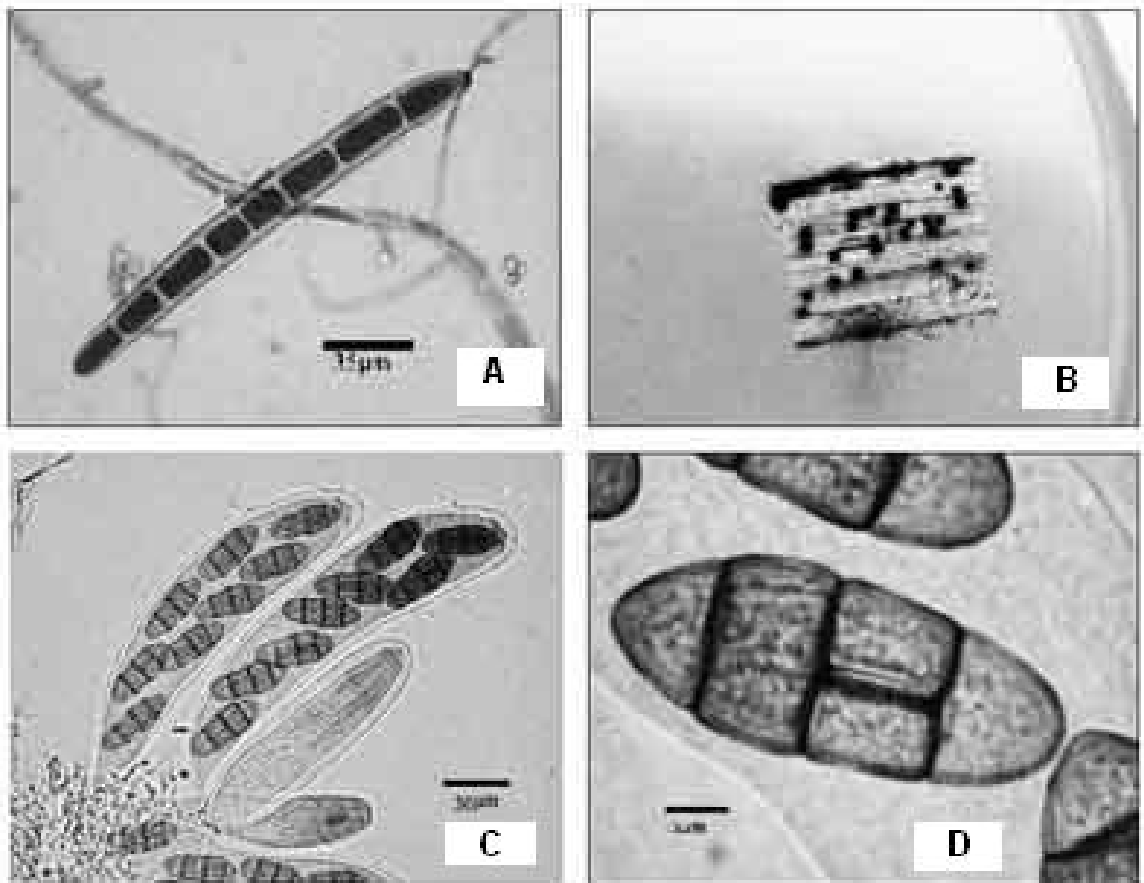
II.2. L'agent causal de la tache foliaire bronzée : L'agent causal de la tache bronzée foliaire du blé est *Pyrenophora tritici-repentis* (Died) Drechs. Dont le stade conidien est *Dreschlera tritici-repentis* = *Helminthosporium tritici-repentis*.

Cette espèce a été rapportée dans la littérature sous plusieurs autres nomenclatures, et ce aussi bien pour la forme parfaite que la forme imparfaite. En effet, le téléomorphe est connu sous les appellations de *Pleospora trichostoma* f. sp. *tritici-repentis* (Died.) Noack, *Pyrenophora tritici-vulgaris* Dickson, et *Pyrenophora trichostoma* (Fr.) Fckl. Alors que son anamorphe est appelé ; *Helminthosporium graminearum* f.sp. *tritici-repentis* (Rab. ex Schlecht) Died., *H. tritici-repentis* (Died.) Died., *H. tritici-vulgaris* Nisikado et *Dreschlera tritici-vulgaris* (Nisikado) Ito, (De Wolf *et al.* 1998 ; Maraite , 1997).

II.2.1. Position taxonomique et caractères morphologiques du champignon : *Pyrenophora tritici-repentis* (Died) Drechs., est classé dans le règne des Fungi, division des Eumycota, subdivision des Ascomycotina, ordre des Pleosporales, famille des Pleosporaceae (Ainsworth *et al.*, 1973).

Les spores sexuées ou ascospores qui constituent la source d'inoculum primaire, sont produites dans des asques à l'intérieur d'un pseudothèce. Les pseudothèces de *P. tritici-repentis* mesurent de 200 à 700 µm environ et sont de forme sphérique et de couleur noire. Les asques sont bituniqués, cylindriques et étroit à la base (Pfender *et al.* 1988), chacun de ces derniers renferme 8 ascospores, de couleur jaune marron et peuvent germer de n'importe quelle cellule (Shoemaker, 1962). Elles mesurent de 40 à 60 µm de longueur et de 18 à 25 µm de diamètre (Zillinsky, 1983), elles sont pluricellulaires possédant trois cloisons transversales et une ou deux longitudinales (Fig. 6).

Pendant la phase asexuée, le champignon produit des conidies mesurant entre 80 et 250 µm de longueur et entre 6 et 9 µm de diamètre, elles sont sub-hyalines, de



(Selon : Anonyme 2003)

Figure 6 : Morphologie de l'agent causal du tan spot. (A) Conidie=spore asexuée (Anamorphe : *Dreschlera tritici-repentis*). (B) Pseudothèces formées sur un fragment de feuilles infectées. (C) Asques contenant des ascospores résultant après maturation des pseudothèces. (D) Ascospore= Spore sexuée (Télomorphe : *Pyrenophora tritici-repentis*).

forme cylindrique pluricellulaire présentant 1 à 9 cloisons. La cellule basale de la spore se caractérise par une forme conique rappelant la tête d'un serpent. Les conidies sont portées par des conidiophores (Fig. 6) dont la longueur varie entre 80 et 400 μm et dont le diamètre varie entre 14 et 20 μm (Zillinsky, 1983)

II.2.2. Gamme d'hôte : Parmi toutes les espèces du genre *Pyrenophora*, l'espèce *P. tritici-repentis* est connue pour avoir une large gamme d'hôtes appartenant principalement aux graminées, et capable d'infecter au moins 26 espèces (Krupinsky, 1992 ; Morral et Howard, 1975). La capacité de ce champignon à infecter un tel nombre d'espèces de graminées dont la plupart sont des espèces spontanées, pérennes se développant dans les zones de culture du blé, représente un véritable atout pour ce champignon. En effet, Cette caractéristique lui permet de surmonter la saison hivernale et de produire également l'inoculum primaire qui est à l'origine du déclenchement d'une épidémie de Tan Spot (Krupinsky, 1982 ; 1987 ; 1992). Par ailleurs, il est capable de survivre sur les résidus de récolte pendant sa phase saprophytique (Krupinsky, 1992 ; Morral et Howard, 1975).

P. tritici-repentis est cependant non pathogène sur l'avoine et l'orge, et faiblement pathogène sur le seigle (Weise, 1987 ; Maraite et al 1992).

II.2.3. Epidémiologie : Les épidémies de Tan spot se caractérisent par une infection primaire initiée par des ascospores en début de saison, suivie par plusieurs infections secondaires provoquées par des conidies durant toute la saison de culture.

En effet, l'agent pathogène se conserve sur les résidus de blé infecté à la surface du sol sous forme de mycélium et de conidies. Des pseudothèces se développent sur les chaumes, ils subissent une maturation durant l'automne et l'hiver, au printemps et en présence d'humidité, ils libèrent les ascospores (Hosford 1971, Morrall *et al.*, 1975 ; Ress *et al.*, 1982) . Les ascospores constituent la principale source d'inoculum primaire (Hosford, 1982. Krupinsky, 1982 ; Raymond *et al.* 1985 ; Ress et Platz, 1992 ; Sutton et Vyn, 1990) ; elles sont dispersées dans les cultures sur des distances limitées (Howard et Morrall, 1975) et sont à l'origine d'épidémies localisées (Schilder et Bergstorm, 1992). Les conidies présentes dans les résidus contribuent également à initier l'infection primaire sur les plantules de blé en début de saison (Adee et Pfender, 1989).

Au cours de la saison, l'infection secondaire est assurée par les conidies, ces dernières sont produites par des conidiophores qui prennent naissance au niveau des lésions résultant de l'infection primaire (Wright et Sutton, 1990). La formation des

conidiophores nécessite de la lumière alors que celle des conidies nécessite de l'obscurité, ce dernier phénomène est favorisé par des conditions d'humidité et des températures modérées (Platt et Morrall, 1980). Il peut se produire sous des températures comprises entre 10 et 31°C, avec un optimum de sporulation observé à 21°C (Platt *et al.*, 1977). L'infection secondaire est ainsi répétée aussi longtemps que les conditions favorables sont assurées, et ce jusqu'à la maturité de la plante (Wright et Sutton, 1990). Ces cycles répétés sont à l'origine du développement rapide de l'épidémie dans l'espace et le temps (Morrall et Howard, 1975 ; Schilder et Bergstrom, 1992a) ; en effet sous les conditions favorables l'agent du tan spot peut initier un cycle secondaire chaque huit jours (Riaz *et al.*, 1991). L'étendue des épidémies pouvant être plus importante à cause du vent, facteur de dispersion des spores qui peut transporter l'inoculum à plus de 50Km (Francl, 1997).

La température et l'humidité sont considérées comme les facteurs les plus déterminants dans la contamination du blé par *P. tritici-repentis*. Le développement de la maladie nécessite des températures comprises entre 18°C et 28°C (Luz et Bergstrom, 1986) et une durée d'humidité comprise entre 18 et 24h (McMullen et Hosford, 1989). Cependant, Lamari *et al.* (1992), ont conclu qu'une humidité continue de 24h et une température avoisinant les 20°C, sont requises pour que l'infection se produise. Dans un autre travail Lamari et Bernier (1994) ont montré que des températures supérieures à 27°C induisent une résistance chez le blé à l'égard de ce pathogène.

P. tritici-repentis peut être transmis à travers la semence ; lorsque la graine est contaminée le pourcentage du passage du champignon à la jeune plantule est presque de 100% (Schilder et Bergstrom, 1992b). Toutefois, l'importance de cette transmission dans le développement de l'épidémie du tan spot n'est pas connue (Fernandez *et al.*, 1998), la transmission du champignon serait limitée uniquement au coléoptile et non pas aux feuilles (Fernandez *et al.*, 1996).

II.2.4. Variabilité de *Pyrenophora tritici-repentis* :

II.2.4.1. La variabilité pathogénique : La variabilité pathogénique des isolats de *P. tritici-repentis* a été étudiée par plusieurs travaux (Misra et Singh, 1972 ; Luz et Hosford, 1980 ; Schilder et Bergstrom, 1990 ; Krupinsky, 1987, 1992). Dans ces études, des mesures quantitatives, telles que la sévérité de la maladie, le nombre de lésion, la taille des lésions et le pourcentage de la surface foliaire infectée ont été notés pour différencier les isolats de *P. tritici-repentis*. Toutefois, cette approche quantitative a très peu apporté dans la compréhension de la relation hôte-pathogène (Lamari et Strelkov, 2010). En effet,

il a fallu attendre les travaux de Lamari et Bernier (1989a, 1991) qui ont clairement montré que la chlorose et la nécrose observées dans le cas de cette maladie, sont deux symptômes distincts et sont le résultat d'une forte interaction spécifique entre l'hôte et le pathogène, pour que les premières bases dans la compréhension de ce pathosystème soit fondées.

Ainsi, une première classification des isolats en pathotypes a été possible ; ceci en se basant sur la capacité de l'isolat à induire chez des génotypes de blé sélectionnés, une nécrose et/ou une chlorose. Grâce à cette méthode quatre pathotypes ont été définis ; pathotype 1 (nec+ chl+) produit les deux symptômes, le pathotype 2 (nec+ chlo-) produit uniquement des nécroses, le pathotype 3 (nec- chl+) produit uniquement des chloroses et le pathotype 4 (nec- chlo-) n'est capable de produire aucun symptôme (Lamari et Bernier, 19989a). Cependant, ce système ne permettait de différencier que quatre groupes, ces limites sont devenues évidentes avec la découverte de nouveaux profils de virulence.

II.2.4.2. Distribution des races de *Pyrenophora tritici-repentis* dans le monde:

Actuellement, le système de ségrégation entre les différents isolats est basé sur la réaction différentielle d'une gamme d'hôtes établie par Lamari *et al.* (1995).

En effet, afin d'établir l'appartenance d'un isolat à une race ou à une autre, il est nécessaire de l'inoculer sur une gamme différentielle composée de quatre génotypes de blé tendre ; il s'agit en l'occurrence des variétés Glenlea et Salamouni et des lignées 6B662 et 6B365. Par la suite deux autres génotypes de blé dur ont été ajoutés à la gamme d'hôtes différentielle ; la variété Coulter et la lignée 4B1149 (Strelkov et Lamari , 2010), toutefois seules les réactions de trois génotypes (Glenlea, 6B662 et 6B365) sont réellement efficaces pour la différenciation entre les races. Ainsi, actuellement huit races sont reconnues dans le monde en fonction des réactions des génotypes précédents (Tab. I) (Strelkov et Lamari, 2010 ; Strelkov et Lamari, 2003).

Ce système a été adopté par la plupart des équipes de recherche à travers le monde et est aujourd'hui, largement utilisé (Lamari et Strelkov, 2010).

Tableau I Réaction de la gamme différentielle vis-à-vis des huit races de *P. tritici-repentis* connues.

Génotype	Races							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Glenlea	S(N)	S(N)	R	R	R	R	S(N)	S(N)
6B662	R	R	R	R	S(C)	S(C)	S(C)	S(C)
6B365	S(C)	R	S(C)	R	R	S(C)	R	S(C)
Salamouni	R	R	R	R	R	R	R	R
Coulter	S(N)	S(N)	S(N)	R	S(N)	S(N)	S(N)	S(N)
4B1149	R	R	R	R	R	R	R	R

S(N) : Sensible avec développement de nécrose. **S(C)** : Sensible avec développement de chlorose. **R** : Résistant

La figure 7 illustre la distribution des différentes races de *P. tritici-repentis* à travers le monde. Les races de 1 à 4 correspondent aux pathotypes 1, 2, 3 et 4 (Lamari *et al.*, 1995), celles-ci ont été en premier isolées à partir d'échantillons de blé infectés, collectés en Amérique du Nord où les races 1 et 2 sont prédominantes (Lamari *et al.*, 1998). Plus tard, elles ont été également retrouvées au niveau des centres d'origine du blé (Lamari *et al.*, 1995). La race 5 a été découverte pour la première fois en Algérie (Lamari *et al.*, 1995), puis retrouvée aux Etats-Unis d'Amérique (Ali *et al.*, 1999), au Canada (Strelkov *et al.*, 2002), en Syrie et en Azerbaïdjan (Lamari *et al.*, 2005). Jusqu'à présent la race 6 n'a été rapportée qu'en Afrique du Nord, alors que les races 7 et 8 n'ont été retrouvées que dans le Moyen-Orient et dans le Caucase (Lamari et Strelkov, 2010 ; Lamari *et al.*, 2005, 2003. Strelkov *et al.* 2002). La plus grande diversité des races est observée selon Lamari et Strelkov (2010) dans ces dernières régions en raison du fait qu'il s'agisse du centre d'origine du blé.

En plus des huit races reconnues et caractérisées, il existe des rapports préliminaires sur l'existence de trois autres présumées races (Meinhardt *et al.* 2003 ; Ali et Francl, 2002. Ali *et al.*, 2002 ; Manning *et al.*, 2002). Plus récemment Moreno *et al.* (2008) ont décrit des isolats capables d'induire des chloroses sur la variété Glenlea, or ce génotype de la gamme différentielle est connu par l'expression de sa sensibilité uniquement à travers des nécroses. Ceci suppose l'existence en Argentine d'autres races.

II.2.4.3. Variabilité génétique de *P. tritici-repentis* : Le génome de ce champignon est très variable (De Wolf *et al.*, 1998), cependant peu de travaux ont été consacrés à l'étude de sa variabilité. Afin d'étudier cette diversité génétique, plusieurs méthodes moléculaires ont été utilisées.



Figure 7 : Distribution des races du *Pyrenophora tritici-repentis* à travers le monde selon Lamari et Strelkov (2010)

Santos *et al.* (2002) ont utilisée la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) pour évaluer le niveau et la distribution de la diversité génétique à l'intérieur d'une population de *P. tritici-repentis* collectée au Brésil. Cette étude a révélé l'existence d'un polymorphisme génétique entre les isolats mais aucune relation entre cette dernière et l'origine géographique des isolats n'a pu être établie. Les mêmes conclusions ont été rapportées par Singh et Hughes (2006) et Singh (2001). En effet, la RAPD a permis à ces auteurs d'étudier la variabilité de 30 isolats canadiens, et de démontrer également qu'aucune corrélation n'existait entre la diversité génétique identifiée et la composition en races. En utilisant le même marqueur moléculaire, Aung (2001) a rapporté que les isolats de la race 4 se réunissaient dans un groupe, séparés des autres isolats étudiés. De même que les isolats responsables de nécroses (race 1 et 2) et ceux entraînant l'apparition des chloroses (3, 5 et 6) se retrouvent réunis séparément dans des sous-groupes différents.

L'utilisation de l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) a révélé aussi l'existence d'un polymorphisme moléculaire entre des isolats collectés en Amérique du Nord, en Amérique du Sud et en Europe (Friesen *et al.* 2005). De même cette variabilité est constatée à l'intérieur d'une collection de 100 isolats collectés en République tchèque, en République slovaque, Russie, Canada, Etats-Unis d'Amérique et Argentine (Leisova *et al.* 2008). Dans ces deux travaux, les auteurs rapportent d'une part l'absence de corrélation entre la diversité notée et l'origine des isolats et d'autre part entre la diversité et la composition en races.

Les marqueurs ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) ont été aussi un outil appréciable dans l'analyse de la variabilité génétique. Cette méthode a révélé une très grande variabilité entre des isolats collectés en Argentine. En effet, à l'intérieur des 37 isolats étudiés, 36 holotypes ont été mis en évidence (Moreno *et al.* 2008).

Par ailleurs, l'étude de la diversité chez ce champignon par trois systèmes enzymatiques : estérases, phosphatases et peroxydases a révélé dans une collection de 150 isolats brésiliens l'existence de 86 profils électrophorétiques différents (Moreno *et al.* 2007).

II.2.5.Toxines produites par *P. tritici-repentis* : Toute interaction compatible entre une souche de cette espèce et son hôte fait intervenir sans exception, une toxine spécifique produite par le champignon (Strelkov et Lamari, 2003). L'appartenance d'un isolat à une race donnée est fonction des toxines produites par ce dernier (Wopler *et al.*, 2002). Ces toxines spécifiques sont des facteurs de pathogénicité (Strelkov et Lamari, 2003) ou des

facteurs de virulence (Friesen et al. 2003), et sont au moins, au nombre de trois PtrToxA, PtrToxB et PtrToxC :

II.2.5.1. Toxine Ptr ToxA : Il s'agit de la première toxine identifiée chez cette espèce (Lamari et Bernier, 1989b), découverte pour la première fois chez les races 1 et 2, elle est également produite par les races 7 et 8 (Lamari et al., 2003). Elle est responsable de l'induction des nécroses chez la plante hôte infectée (Lamari et Bernier, 1989b), et est considérée comme un facteur de pathogénicité (Ciuffetti et al., 1997). De nature protéique et de bas poids moléculaire d'environ 13,2kDa (Ballance et al., 1989 ; Tomas et al., 1990 ; Tuori et al., 1995 ; Zhang et al., 1997), sa synthèse est contrôlée par un gène unique nommé ToxA. Le clonage de ce dernier, a révélé qu'il codait au préalable pour une protéine de 19,7kDa qui subit par la suite une maturation impliquant le clivage d'un polypeptide d'environ 22 acides aminés, produisant ainsi la toxine mature (Ballance et al., 1996 ; Ciuffetti et al., 1997). La composition biochimique et la structure de cette protéine révélée par cristallographie, laisse supposer une possibilité de liaison de cette dernière à un récepteur spécifique dans les cellules hôtes (Meinhardt et al. 2002 ; Sarma et al., 2005).

Le mécanisme exact de l'action de cette toxine sur les cellules hôtes reste toujours non élucidé (Lamari et Strelkov, 2010). Cependant il a été montré que la présence de la lumière (Manning et Ciuffetti, 2005) et d'un métabolisme actif chez l'hôte (Kwon et al., 1998 ; Rasmussen , 1997), étaient indispensables à l'induction des nécroses et donc à son activité. Dans les cellules hôtes d'un génotype sensible, Ptr ToxA est localisée au niveau du cytoplasme et des chloroplastes, (Manning et Ciuffetti, 2005). Dans les chloroplastes elle interfère avec le fonctionnement des photosystèmes I et II (Manning et al., 2009 ; Oliva et al., 2010). Au niveau moléculaire il a été observé que la toxine interagit avec une protéine chloroplastique ToxABP1 (Manning et al., 2007), l'interaction Ptr ToxA-ToxABP1 altère le fonctionnement de la protéine chloroplastique ce qui semble être un facteur important mais pas exclusif dans l'action de la toxine et la mort de la cellule (Manning et al. 2010). L'analyse du transcriptome induit par l'action de Ptr ToxA, soutient que la mort des cellules serait due à l'altération du mécanisme de la photosynthèse (Pandelova et al., 2009).

Le gène ToxA est localisé sur un chromosome de 3Mb (Lichter et al., 2002) , il est présent en copie unique chez toutes les races de *P. tritici-repentis* produisant la Ptr ToxA , alors qu'il apparait complètement absent chez les autres. ToxA semble être très conservé chez les isolats collectés à partir de différentes régions géographiques (Ballance et al., 1996 ; Ciuffetti et al., 1997 ; Friesen, 2006). Néanmoins, un homologue du gène ToxA a

été découvert chez *Stagonospora nodorum* (Berk) E. Castell. et Germano, agent de la Moucheture du blé (stagnosporose) (Friesen, 2006). Sa grande diversité chez cette espèce permet de suggérer que ce gène a été acquis récemment chez l'agent du Tan spot suite à un transfert horizontal de gène à partir de *S. nodorum* (Friseen *et al.*, 2006 ; Olivier et Solomon, 2008)

II.2.5.2. Toxine Ptr ToxB : Découverte en premier chez la race 5, elle est responsable de la production des chloroses chez des génotypes de blé sensibles (Orolaz *et al.*, 1995), et est également produite par les races 6, 7 et 8 (Strelkov et Lamari, 2003). Cette toxine est aussi une protéine de bas poids moléculaire, de 6,6 kDa (Strelkov *et al.*, 1999), sa synthèse est contrôlée par le gène ToxB. Le clonage de ce dernier a démontré qu'il codait pour une pro protéine de 87 acides aminés qui après un clivage et la perte d'un polypeptide de 23 acides aminés, aboutit à la toxine active de 64 résidus (Martinez *et al.*, 2001. Strelkov, 2002).

Le mode d'action exact de PtrToxB reste également à déterminer (Lamari et Strelkov, 2010). Les travaux de Zhang *et al* (1997) ont révélé la présence dans cette protéine de plusieurs sites de phosphorylation qui seraient responsables de sa phytotoxicité, de même qu'ils ont montré que sa composition biochimique, présente des sites potentiels d'attachement membranaires. Il est reconnu toutefois l'existence d'une inhibition de la photosynthèse, suite à une photo-oxydation de la chlorophylle (Strelkov *et al.*, 1998).

Le gène ToxB et contrairement à ToxA est présent en multiples copies de séquences différentes chez les races produisant la Ptr ToxB en l'occurrence les races 5, 6, 7 et 8 (Martinez *et al.*, 2001 ; Strelkov 2002 ; Lamari *et al.*, 2003 ; Strelkov *et al.* 2003 ; Martinez *et al.*, 2004 ; Strelkov *et al.*, 2006). Une forme de ce gène existe également chez la race 5 isolée au Canada connue pour produire des quantités très faibles de Ptr Tox B (Strelkov, 2002 ; Strelkov *et al.* 2002). Des homologues du gène ToxB ont été aussi identifiés chez des isolats représentant les races 3 et 4, chez qui aucune activité détectable de la toxine Ptr ToxB n'est connue (Martinez *et al.*, 2004 ; Strelkov *et al.*, 2006). Leur rôle chez ces races reste mal élucidé ; chez la race 4 (avirulente), le gène *toxb* est exprimé très faiblement (Amaike *et al.*, 2008), il serait impliqué dans ce pathosystème comme pseudo gène (Andrie *et al.*, 2008). Par ailleurs, des homologues des ToxB ont été également identifiés chez d'autres Pleosporaceae, ce qui suppose que ce gène a été acquis chez *P. tritici-repenris* à partir d'un ancien ancêtre appartenant aux Ascomycota (Andrie *et al.*, 2008).

II.2.5.3. Toxine PtrC : Cette toxine est responsable également de la production de chlorose chez les tissus hôtes infectés par *P. tritici-repentis*. Toutefois, cette induction est observée sur des génotypes de la gamme différentielle qui sont différents de ceux chez qui, la Ptr ToxB est détectée (Strelkov et Lamari 2003). Elle est produite par la race 1 (Effertz *et al.*, 2002) et supposée produite également par les races 3, 6, et 8 (Strelkov et Lamari 2003 ; Singh *et al.* 2010.)

Contrairement aux deux premières toxines, l'analyse de la Ptr ToxC partiellement purifiée a révélé qu'elle n'est pas de nature protéique, qu'elle semblerait être une molécule polaire, non ionique et de bas poids moléculaire (Effertz *et al.*, 2002). Les données concernant la nature exacte de cette toxine restent encore non disponibles (Lamari et Strelkov, 2010). Il n'en demeure pas moins que les analyses génétiques ont montré clairement qu'elle agissait comme un facteur de pathogénicité important (Lamari et Bernier, 1991 ; Gamba et Lamari, 1998 ; Gamba *et al.*, 1998).

Deux autres toxines ont été rapportées séparément par deux équipes de recherche sous la même dénomination de Ptr ToxD. Selon Ali *et al.* (2002), cette toxine produit des chloroses étendues sur le génotype de ND495 qui est connu pour être insensible à l'égard de la toxine Ptr ToxC, alors que Manning *et al.* (2002) rapporte que Ptr ToxD provoque des nécroses. La caractérisation de ces présumées toxines reste à réaliser.

Par ailleurs, en plus des toxines spécifiques, *P. tritici-repentis* produit de nombreux composés toxiques non spécifiques ; des **spiro-cyclique lactamases** (Hallock *et al.*, 1993) et des anthraquinone catenarine (Bouras et Strelkov, 2008), ces derniers inhiberaient la croissance de la microflore fongique présente durant la phase saprophytique du champignon (Wakulinki *et al.* 2003). Le rôle des composés toxiques non spécifiques dans le développement des symptômes est peu important comparé aux toxines spécifiques, mais ils pourraient contribuer à l'agressivité des isolats virulents (Bouras et Strelkov, 2008).

II.3. La relation du gène pour gène dans l'interaction blé/ *P. tritici-repentis* : La réaction du blé à l'égard de *Pyrenophora tritici-repentis* est sous la dépendance de gènes majeurs de type mendélien (Faris *et al.*, 1996 ; Gamba et Lamari, 1998 ; Gamba *et al.*, 1998 ; Lamari et Bernier, 1989b ; Lamari et Bernier, 1991 ; Stock *et al.*, 1996). En effet trois *loci* responsables de la sensibilité, ont été identifiés chez les génotypes Glenlea, 6B365 et 6B662. De même, la sensibilité du blé à l'égard de chacune des toxines est sous le contrôle d'un seul gène dominant dont la transmission est indépendante (Gamba et Lamari, 1998 ; Gamba *et al.*, 1998). Il a été démontré également que la sensibilité du

blé au champignon et sa sensibilité aux toxines qu'il produisait ségrégeaient ensemble, ce qui indique que les deux sensibilités étaient contrôlées par les mêmes gènes (Lamari et Bernier, 1991 ; Gamba et Lamari, 1998 ; Gamba *et al.*, 1998 ; Singh et Hughes , 2006). Ces résultats ont suggéré que l'interaction blé/ *P. tritici-repentis* était très similaire à une relation du gène pour gène. Ainsi, en utilisant le modèle « ideal gene-for-gene system » développé par Person (1959), Lamari *et al.*, (2003), ont proposé l'existence d'une relation « gène pour gène » dans l'interaction Blé/ *Pyrenophora tritic-repentis*. Cette relation se présente comme une image renvoyée par un miroir (Ellingboe, 1976) du modèle classique de la relation « gène pour gène » émis par Flor (1955). La principale différence par rapport à ce dernier, réside dans le fait que la compatibilité est le résultat d'une interaction spécifique entre une toxine produite par le pathogène et son présumé récepteur chez la plante hôte, ce qui correspond à la réaction d'incompatibilité connue dans la théorie de Flor, en effet, dans le modèle classique c'est la résistance qui est la conséquence d'une interaction spécifique entre un gène de résistance chez la plante et un gène d'avirulence chez le pathogène (Fig. 8). Par conséquent, la résistance dans le pathosystème blé/*Pyrenophora tritici-repentis* résulte de l'absence d'un gène de sensibilité plutôt que de la présence d'un gène de résistance (Singh *et al.*, 2010). De plus, il a été démontré l'existence d'un QTL chez un blé sensible qui détermine la compatibilité spécifique entre l'hôte et le pathogène (PtrTox C), ce qui représente un appui considérable au modèle de l'image inversée de la relation du gène pour gène (Sun, 2004).

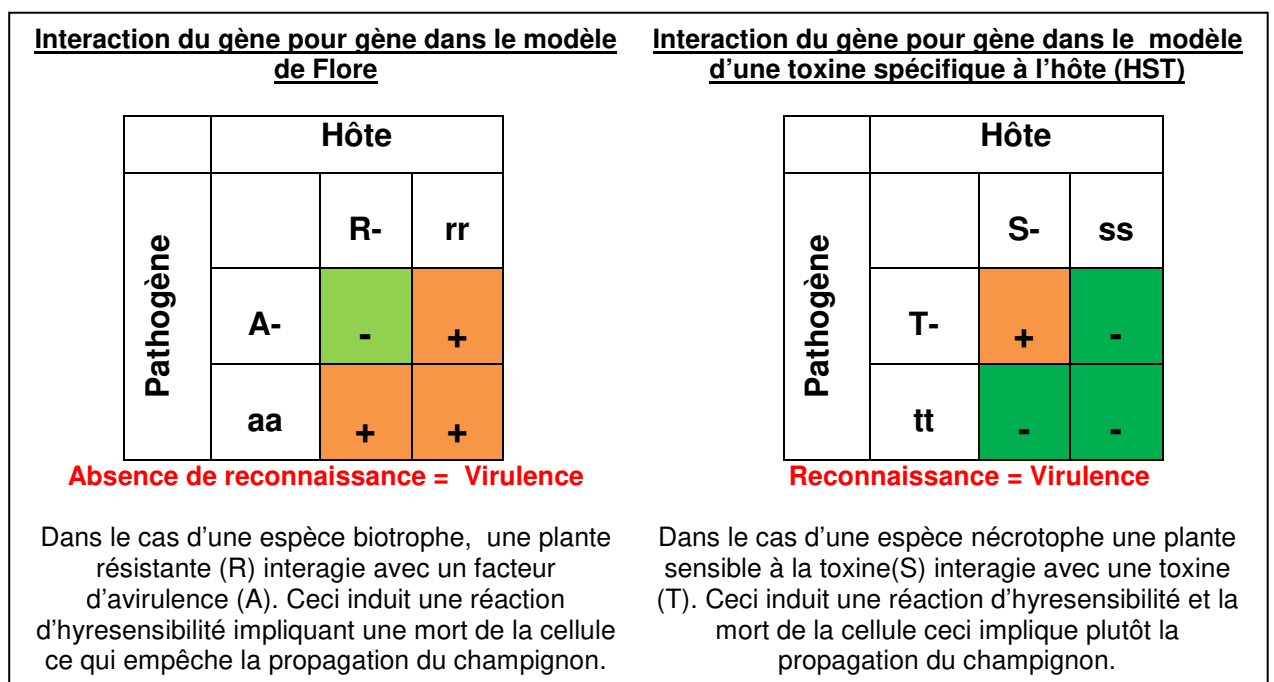


Figure 8 : Comparaison entre le modèle classique du gène pour gène et le modèle du gène pour gène dans le cas d'une toxine spécifique à l'hôte, selon Stukenbrock et McDonald (2009).

II.4. Les moyens de lutte : Plusieurs moyens de lutte existent pour lutter contre *P. tritici-repentis* ; elle peut être culturale, chimique, génétique ou encore biologique (Ciuffetti et Tuori 1999).

II.4.1. Lutte culturale : L'élimination de l'inoculum primaire est une stratégie importante dans la lutte contre *P. tritici-repentis* (Sutton et Peng, 1993). Dans cette option, la destruction par l'enfouissement ou l'incinération des chaumes et des résidus de cultures infectés, contribue à l'élimination ou à la diminution de cet inoculum (Adee et Pfender, 1989). Il est également très recommandé de pratiquer des rotations culturales (Duveiller and *al.*, 2007) ; le blé ne doit pas être cultivé plus d'une année sur trois sur la même parcelle, cette dernière doit être occupée entre temps par une culture non hôte du *P. tritici-repentis* (Summerell et Burgess, 1989). Il est recommandé également d'éviter les semis produisant une densité de végétation excessive (Hershman et Vincelli, 1997). Enfin, l'augmentation de la fertilisation azotée et plus particulièrement sous la forme d'ammoniaque, semble réduire le développement des lésions provoquées par le Tan Spot (Krupinsky et Tanaka, 2001 ; Huber *et al.*, 1987). Ceci serait dû à un retardement dans l'apparition de la sensibilité plutôt qu'à un effet direct sur la maladie (Bockus et Davis, 1993). L'importance de la fertilisation potassée dans le contrôle de cette maladie a été également mis en évidence récemment (Sharma et Duveiller, 2004 ; Sharma *et al.*, 2005). De même l'application foliaire de micronutriments (Bore, Manganèse et Zinc) peut être utilisée afin de réduire la sévérité de la maladie, cependant les bases physiologiques de cette action restent inconnues (Simoglou et Dordas, 2006).

II.4.2. Lutte chimique : Celle-ci repose sur l'utilisation de fongicides dont plusieurs produits efficaces contre le *P. tritici-repentis* existent dans le commerce (<http://www.bvl.bund.de/>; <http://www.ext.nodak.edu/extpubs/plantsci/pests/pp1249w.htm>) (Reimann et Deising, 2004). Les applications foliaires des fongicides doivent être des traitements préventifs pour empêcher l'installation de la maladie ; elles doivent nécessairement être pratiquées avant l'apparition d'une infection sévère sur les parties supérieures de la plante (Hershman et Vincelli, 1997). Le moment optimal des traitements correspond à la période qui suit directement la tombée des pluies ou l'irrigation (Colson *et al.*, 2003). Sous les conditions favorables à un développement sévère de la maladie, trois traitements foliaires pourraient être requis. Toutefois, un à deux traitements permettent souvent un contrôle satisfaisant de la maladie et s'avèrent plus rentables (Jørgensen et Olsen, 2007).

En outre, le traitement des semences peut s'avérer comme un moyen utile dans le cadre d'une lutte intégrée (Duveiller, 2004). Il a été montré par Lamari (2000) que le traitement des semences par certains fongicides systémiques était d'une part un moyen de lutte efficace au niveau de la graine, et d'autre part qu'il pouvait contribuer à la réduction des dommages causés par le pathogène au niveau du feuillage durant les premiers stades de la croissance de la plante.

Enfin, il est à signaler que malgré l'existence d'une importante bibliographie traitant des modalités de l'utilisation des fongicides, il est indispensable d'optimiser ces méthodes selon les conditions locales de l'utilisateur. Ceci en tenant compte des variétés cultivées, des fongicides utilisés et des conditions environnementales qui peuvent affecter l'efficacité du traitement (Bockus, 1998)

II.4.3. Lutte biologique : C'est une méthode de lutte impliquant l'utilisation de microorganismes antagonistes à ce champignon (Bockus, 1998). Certains champignons ont été décrits comme possédant cette propriété, tels ; *Limonomyces roseipellis* (Pfender *et al.* 1991) et *Cochliobolus sativus* (Luz et Bergstrom, 1987). Cependant, ces deux espèces se trouvent pathogènes sur le blé.

Trichoderma harzianum, *Trichoderma aureoviride* et *Trichoderma koningii* inhibent la croissance du champignon *in vitro* et réduisent significativement la sévérité de la maladie *in vivo* (Perello *et al.*, 2003). La croissance de *P. tritici-repentis* est également inhibée par *Chaetomium* spp. grâce à un ensemble de métabolites produits en culture liquide (Istifadah *et al.*, 2006). De même, il existe des bactéries ayant un effet antagoniste ; *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, inoculé a des résidus de récolte permet de stopper la formation des ascocarpes, ce qui réduit considérablement l'inoculum disponible (Pfender *et al.*, 1993). Alors que le *Bacillus* sp. affecte la germination des spores (Perello *et al.*, 2002).

Il est également possible, dans une seconde approche de réaliser le traitement des semences par des « bio-protecteurs ». Parmi ces derniers nous citerons : *Paenibacillus macerans*, *Pseudomonas putida*, *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma virens*. Ces derniers favorisent l'émergence des plantules et augmentent le rendement en grains de manière significative (Luz *et al.*, 1998).

L'utilisation des éliciteurs de la résistance est une approche alternative, suggérée par certains chercheurs ; ainsi le Xantham Gum, qui est un exo-polysaccharide commercialisé, extrait à partir de la capsule de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* a été utilisé par Bach *et al.* (2003). Ces derniers ont montré que l'application du Xantham

Gum, 48h avant l'infection par l'agent du tan spot, induisait une protection locale et systémique contre la maladie.

II.4.4. Lutte génétique : Il s'agit là sans doute, du moyen de lutte le plus efficace, le plus économique et le plus respectueux de l'environnement. Il consiste en l'utilisation en culture de génotypes résistants au *P. tritici-repentis*. Des résistances de haut niveau ont été identifiées chez les blés appartenant à tous les types de ploïdie (Lamari et Bernier, 1989c ; Singh *et al.*, 2006b). Ainsi, des sources de résistance ont été signalées dans différentes régions du globe à travers plusieurs travaux (Rees et Platz, 1990 ; Gilchrist , 1992 ; Siedler *et al.*, 1994. Sharma *et al.*, 2004a, 2004b ; Xu *et al.*, 2004 ; Flemming , 2005 ; Singh *et al.* 2006b ; Singh et Mergoum, 2006; Mergoum *et al.*, 2006 ; Tadesse *et al.* , 2007b ; Ali *et al.*, 2007; Gurung *et al.*, 2009).

Par ailleurs, des résistances ont été également trouvées chez des espèces sauvages apparentées, notamment chez *T. monococcum*, *Aegilops tauschii*, *T. turgidum*, *T. persicum*, *T. timopheevii*, *T. spelta*, *T. zukhovskii* (Lamari et Bernier, 1989a ; Singh *et al.*, 2006b ; Zhang et Jin, 1998), *Ae. Speltoides*, *Ae. triaristata* , *Ae cylindrica* et *Ae. Ovata* (Alam et Gustafson, 1988).

En Algérie, les variétés locales sont très sensibles alors qu'une résistance variétale notable existe chez plusieurs cultivars améliorés : INRAT69 et Ziad (Sayoud *et al.*1999).

II.5. Mécanisme de résistance du blé à l'égard de *Pyrenophora tritici-repentis* : Certains auteurs pensent que la résistance du blé à l'égard du *P.tritici-repentis* est mono-génique, alors que d'autres estiment qu'elle est polygénique.

Plusieurs gènes responsables de la résistance mono-génique des blés à la nécrose ont été identifiés. Des études de génétique classique ont montré que la résistance à la nécrose impliquant les races 1 et 2 est sous le contrôle d'un gène récessif aussi bien chez le blé dur que le blé tendre (Lamari et Bernier, 1989c, 1991 ; Gamba et Lamari, 1998 ; Gamba *et al.*, 1998 ; Singh et Hughes, 2005. Singh *et al.*, 2008a) ; ce gène nommé *Tsr1* (McIntosh *et al.*, 2008) est localisé sur le chromosome 5BL (Anderson *et al.*, 1999 ; Faries *et al.*, 1996 ; Stock *et al.*, 1996). Un autre gène récessif *Tsr2* localisé sur le chromosome 3BL contrôle la résistance à la nécrose induite par la race 3(Gamba et Lamari, 1998 ; Singh *et al.*, 2006a). Tadesse et al. (2006a et b, 2007a) ont identifié les gènes *Tsr3* sur le chromosome 3DS et *Tsr4* sur le chromosome 3A, responsables de la résistance également à l'égard de la race 1. De même, les travaux de Gamba et Lamari (1998) et Singh *et al.* (2008b) ont identifié le gène *Tsr5* responsable de la résistance du

blé à l'égard de la nécrose produite par la race 5, ce dernier gène a été cartographié sur le chromosome 3BL (Singh *et al.* 2008b).

Trois autres gènes contrôlant la résistance à la chlorose ont également été rapportés. Le premier est nommé *Tsr6*, son locus est situé sur le chromosome 2BS (Singh *et al.*, 2008c). Il est responsable de la résistance d'un blé tendre à la chlorose provoquée par la race 5. Le second contrôle la résistance d'un blé tendre à la chlorose induite par les races 1 et 3 (Gamba *et al.*, 1998 ; Lamari et Bernier, 1991 ; Singh et Hughes, 2006b), est localisé sur le chromosome 1AS (Effertz *et al.* , 2002). Enfin, le dernier détermine la résistance à la chlorose induite par la race 1 chez un blé dur (Gamba et Lamari, 1998).

De plus, selon plusieurs travaux, la résistance du blé à l'égard du *P. tritici-repentis* est de nature qualitative. Nagle *et al.* (1982) qui ont analysé le déterminisme génétique de cette résistance, conclurent que celui-ci est complexe et qu'il ne correspondait pas à une transmission mendélienne. Selon Ress (1987), il existerait plus de quatre gènes récessifs responsables de la résistance, alors que selon Friesen *et al.* (2002), ils seraient au nombre de quatre ou cinq. Les mêmes conclusions sont émises par Elias *et al.* (1989) qui qualifient la résistance du blé dur à l'égard de ce pathogène comme polygénique.

Dans le but d'identifier des sources de résistance, différentes équipes de recherche à travers le monde, se sont orientées ces dernières années vers la recherche de QTLs (Quantitative Trait Locus). Cette investigation a permis de cartographier plusieurs de ces *loci* dans des régions différentes du génome du blé (Friesen et Faris, 2004 ; Faris et Friesen, 2005 ; Singh *et al.*, 2008d, Chu *et al.*, 2008). Dans le même objectif, les puces de diversité ou marqueur DArT (Diversity Array Technology) ont été employées ; les résultats ont montré que des régions des chromosomes 1AS, 1BS, 6BS, 4AL, 6AL, 2BL, 3BL, 5BL, et 7BL jouaient un rôle important dans la résistance du blé vis-à-vis de la race 1 du *P. tritici-repentis* (Crossa *et al.*, 2007). Des marqueurs DArT correspondant aux gènes *Tsr1* et *Tsr6* ont été aussi identifiés (Singh *et al.*, 2010b).

II. 6. Méthodes moléculaires utilisées pour la caractérisation des champignons phytopathogènes : Les méthodes moléculaires sont universellement applicables et permettent d'explorer le polymorphisme à différents niveaux (comparaison entre des souches, des espèces, des genres, etc.) (Verscheure *et al.*, 2002). Elles permettent d'explorer l'énorme variabilité naturelle existante au niveau de l'ADN (Xu, 2010). Ceci s'est révélé très important dans la mesure où la connaissance des relations génétiques dans une population pathogène est indispensable pour le développement de nouvelles

variétés résistantes et la mise au point de stratégie de contrôle des épidémies. En effet, malgré l'intérêt des marqueurs de virulence qui sont mis en évidence via les tests du pouvoir pathogène, ceux-ci ne révèlent qu'une petite portion de la diversité génétique présente dans une population pathogène. Alors qu'il est admis que les marqueurs moléculaires qu'ils soient de type protéines ou ADN, sont indépendants de la sélection de l'hôte et permettent une étude de la biodiversité directement au niveau du génome. Mais, les marqueurs moléculaires basés sur l'analyse d'ADN sont actuellement préférés à ceux basés sur l'analyse des protéines lors de la caractérisation des différents champignons phytopathogènes.

II.6.1. Méthodes basées sur l'analyse des protéines : Elles comportent l'étude des protéines totales, des allozymes et le plus souvent l'étude des isozymes. Il existe diverses études où cette dernière approche a été utilisée pour la différenciation et la caractérisation entre les isolats, les formes spéciales ou les races de plusieurs champignons phytopathogènes (Burdon et Marshall, 1981 ; Berner *et al.*, 1983 ; Alfenas *et al.*, 1984 ; Lin *et al.*, 1989 ; Fofana *et al.*, 1992 ; Weitz *et al.*, 1993).

Les marqueurs de type isozymes ont montré leurs limites, car pour chaque système enzymatique les conditions optimales d'extraction et d'utilisation des tampons doivent être déterminées. De plus, la variation intra-spécifique peut être trop faible pour être détectée avec ce type de méthode. Enfin, certaines enzymes sont exprimées uniquement à des stades de développement particulier ou peuvent être spécifiques à certains tissus (Michelmore et Hulbert, 1987).

II.6.2. Méthodes basées sur l'analyse de l'ADN : Un large spectre de méthodes rentre dans la coupole des techniques basées sur l'étude de l'ADN. Parmi les plus utilisées, nous discuterons de la RFPL (Restriction Fragment Length Polymorphism), de la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), de l'AFLP (Amplified Fragment Length) et des microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeat). Chacun de ces marqueurs moléculaires présente des avantages et des inconvénients :

II.6.2.1. La RFPL (Restriction Fragment Length Polymorphism) : Le polymorphisme de taille des fragments de restriction implique une digestion de l'ADN génomique par des enzymes de restriction, générant plusieurs fragments. Les bandes sont alors identifiées individuellement grâce à une hybridation avec une sonde appropriée (Apuya *et al.*, 1988). C'est un outil important dans l'identification de la diversité inter et intra-spécifique (Southern, 1979). Lors de l'étude d'un fragment d'ADN ou d'un gène

particulier, la digestion enzymatique peut être précédée d'une PCR (Frisvad *et al.*, 1998), on parle alors de la PCR-RFPL. Cette dernière approche est largement exploitée pour l'étude de plusieurs espèces fongiques ; lorsqu'elle est suivie d'un séquençage des fragments générés, elle est très utile pour les investigations afférentes à la variabilité entre souches, l'évolution des populations et celle des espèces (Xu, 2010). Dans cette optique, les régions ITS (Internal Transcribed Spacers) sont largement utilisées pour la comparaison entre espèces (Nasraoui et Lepoivre, 2003) ; ce sont probablement les régions les plus séquencées chez les champignons actuellement. De même, les IGS (Inter Genitic Spacer), sont d'avantage recommandés pour l'étude de la diversité intra-spécifique car ces séquences possèdent la variabilité la plus importante observée au niveau de l'ADN ribosomique. Enfin, il est à noter que la PCR-RFLP peut générer d'excellents marqueurs co-dominants de grande stabilité et reproductibilité, idéale aussi bien pour les organismes haploïdes que diploïdes (Xu *et al.*, 1999).

II.6.2.2. La RAPD (Random Amplified Polymorphic) : Elle consiste en l'amplification par PCR de fragments de l'ADN génomique en utilisant des amorces arbitraires de courte taille (10pb) (Williams *et al.*, 1990). L'analyse via cette méthode révèle deux types de variation génétique ; celle de la longueur du fragment qui sépare deux sites d'hybridation de l'amorce, et la variation dans la séquence du site d'hybridation (Xu, 2001). Cette technique est reconnue pour être simple et rapide et ne nécessitant pas de connaissance préalable de la séquence. Son inconvénient majeur réside dans le fait qu'elle manque de reproductibilité car elle est très sensible à la concentration en ADN et aux conditions d'amplification (Najimi *et al.*, 2003).

Elle a été utilisée afin d'évaluer le niveau de la diversité génétique entre les races de plusieurs champignons phytopathogènes (Chen *et al.*, 1993 ; Kolmer *et al.*, 1995 ; Borchardt *et al.*, 1998 ; Gonzalez *et al.*, 1998 ; Hamelin *et al.*, 1998). Elle a été également l'outil d'identification et de discrimination entre les pathotypes d'autres espèces (Kelly *et al.*, 1994 ; Goodwin et Annis, 1991). De même qu'elle a été largement employée pour la discrimination entre isolats de provenances diverses (Vakalounakis et Fragkiadakis, 1999 ; Singh, 2001 ; Santos *et al.* 2002 ; Singh et Hughes, 2006). Elle permet aussi la mise en évidence de certains marqueurs ; tel chez *Pyrenophora teres f. teres* chez qui un marqueur RAPD associé à une faible virulence a été identifié (Weiland *et al.*, 1999). Enfin, elle est recommandée pour le développement d'empreinte génétique utilisé comme marqueur épidémiologique (Xu, 2010).

II. 6. 2. 3. L'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphic) : Elle est basée sur l'amplification sélective des fragments de restriction. Elle comporte trois étapes ; (i) l'ADN

génomique est clivé par deux enzymes de restriction, puis des adaptateurs de séquences connues et spécifiques des enzymes de restriction utilisées, sont ajoutés aux extrémités des fragments. (ii) l'amplification sélective des fragments de restriction : Une première amplification, dite pré- amplification est réalisée à l'aide d'amorces de séquences complémentaires à la séquence des adaptateurs et des sites de restriction. La deuxième amplification, dite sélective, utilise des amorces identiques aux premières mais prolongées à l'extrémité 3' de 1 à trois nucléotides. Ces amorces sélectives permettent de réduire le nombre de fragments amplifiés à une centaine. (iii) l'analyse des fragments amplifiés est réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Vos *et al.*, 1995). Cette technique est puissante, stable, rapide, ne nécessitant aucune connaissance préalable des séquences du génome étudié (Najimi *et al.*, 2003). Toutefois, elle nécessite une très bonne qualité de l'ADN et un niveau de technicité important.

La technique AFLP s'est révélée être un outil très précieux dans les études des structures génétiques des champignons et leur diversité. Sa grande sensibilité génère plus d'information sur la variabilité que toute autre technique moléculaire (Majer *et al.*, 1996). Son application a été rapportée à titre d'exemple, sur *Septoria* (Kema *et al.*, 2002 ; Schnieder *et al.*, 1998), *Leptosphaeria* (Pongam *et al.*, 1999) , *Fusarium* (Abd-Elsalam *et al.*, 2002) et *Pyrenophora tritici-repentis* (Leisová *et al.*, 2008 ; Friesen *et al.* 2005).

II. 6. 2. 4. Les microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeat) : Les microsatellites sont constitués de séquences de di-, tri- ou tétranucléotides répétés en tandem. Ces éléments sont uniformément répartis en plusieurs exemplaires sur l'ensemble du génome d'une espèce et présente un taux de polymorphisme élevé. Ce dernier est dû à la variation du nombre d'unités de répétition constituant le microsatellite (Morgante et Olivieri, 1993). Par conséquent, la technique SSR repose sur l'amplification de ces motifs et la détection de la différence entre le nombre de répétition chez les individus différents. Ceci est possible après le développement d'amorces complémentaires des régions flanquant le microsatellite (Field *et al.*, 1996). Cette méthode présente l'avantage d'être reproductible et nécessite peu d'ADN, mais elle est longue et coûteuse (Verscheure *et al.*, 2002).

Elle a été, à l'origine, utilisée pour évaluer la diversité chez les végétaux et animaux puis utilisée actuellement pour l'étude des champignons (Guo, 2010). Cependant, les microsatellites des espèces fongiques semblent exhiber un polymorphisme moins important que celui des autres organismes (Dutech *et al.*, 2007). Ainsi, la technique SSR a été employée dans plusieurs travaux traitant de diversité

moléculaire d'espèces fongiques. A titre d'exemple ; chez *Phaeosphaeria nodorum*, l'utilisation de cette méthode sur une collection de 693 isolats provenant de champs de blé des cinq continents, a montré l'existence d'une très grande diversité chez cette espèce mais un faible niveau de diversité entre les groupes provenant de continents différents. De même qu'il a été possible de montrer que la similitude génétique observée entre les populations était due au taux de migration qui a permis de réduire la différenciation des populations (Stukenbrock *et al.*, 2006). L'amplification des microsatellites des ADN d'une collection d'*Ascochyta rabiei* a permis de classer les isolats en plusieurs groupes, mais aucune corrélation avec l'origine géographique n'a été retrouvée (Bayraktar *et al.*, 2007).

Matériel et Méthodes

III. 1. Matériel :

III.1.1. Matériel fongique : Des prospections ont été réalisées sur les cultures de blé durant les campagnes agricoles 2004/2005, 2005/2006 et 2006/2007 dans différentes régions céréalières du pays. Le diagnostic a touché aussi bien les cultures de blé dur que celles du blé tendre. Il a été basé sur l'observation du symptôme typique du tan spot, caractérisé par une nécrose de forme ovale, entourée d'une chlorose régulière. Certains symptômes suspects pouvant également être dus au *P. tritici-repentis*, ont été aussi considérés tels que la lésion nécrotique et la chlorose localisée en lésion ovale.

Les isolats fongiques ont été obtenus à partir de limbe foliaire de blé présentant les symptômes typiques de la maladie. Ces isolats proviennent des régions céréalières du centre (Alger, Boumerdès, Blida, Tizi-Ouzou, Bouira et Médéa), de l'Est (Béjaia, Mila, Constantine, Guelma) et de l'Ouest (Tipaza, Ain Defla et Mascara).

Par ailleurs une partie des isolats utilisés et notés NA, provenant de la région de Annaba et certaines régions de l'Est du pays nous a été fournie par le laboratoire de phytopathologie de l'Université du Manitoba. Ces isolats étaient conservés sous forme de spores dans une solution de glycérine à une température de -82°C. De même que quatre souches de références ; Asc1, 86-124, 90-2, Alg-3-24 correspondant respectivement aux races 1, 2, 4 et 5 nous ont été fournis par le même laboratoire et ont été utilisés comme témoin.

Le tableau II présente les différents isolats étudiés, leur origine géographique et l'hôte à partir duquel ils ont été isolés. Le tableau III rapporte les origines des isolats ainsi que les souches de référence fournies par l'université du Manitoba, Canada.

III.1.2. Matériel végétal : Afin d'étudier la distribution des races dans les différentes régions céréalières du pays, nous avons utilisé une gamme différentielle composée de 7 génotypes de blés. Ces derniers sont composés de quatre blés tendres qui sont Glenlea, 6B662, 6B365, Salamouni, et trois blés durs, il s'agit de 4B160, Coulter et 4B1149. Lors d'une confirmation de résultats, nous avons également utilisé la variété Katepwa qui est un blé tendre. Les variétés et lignées utilisées nous ont été fournies par le laboratoire de Phytopathologie de l'université du Manitoba, Winnipeg, Canada.

Le choix des génotypes est justifié par leurs réactions connues à l'égard des huit races du *P. tritici-repentis* (Lamari et Bernier, 1989; Strelkov *et al.*, 2002; Lamari *et al.*, 2003) (Tab. IV).

Tableau II : Désignation, espèce hôte, origine géographique et années d'isolement des isolats collectés lors des prospections menées à travers les zones céréalières du pays

Code	Espèce	Variété	Localité	Région	Année
Ptr1	Blé tendre	Hiddab	Oued Athmania	Mila	Printemps 2006
Ptr2	Blé tendre	//	Oued-Abbas (Djendel)	Ain Defla	
Ptr3	Blé dur	Vitron	Benbchir		
Ptr4	Blé dur	Vitron	Berboucha (EAC13)	Tipaza	
Ptr5		Glenea	Station de l'INA (El-Harrach)	Alger	
Ptr6	Blé dur	//	Entrée de Djendel	Ain Defla	
Ptr7	Parcelle de mélange de BD, BT et orge			Bouira	
Ptr8	Blé dur	GTA/dur	Didouche Mourad	Constantine	
Ptr9	Blé dur	Vitron	Cherchell	Tipaza	
Ptr10	Blé dur	Chen's	Station de l'ITGC d'E Oued - Esmar	Alger	
Ptr11	Blé dur	Chen's	Oued-Elalaia	Blida	
Ptr12	Blé tendre	Hiddab	Ain-Sbara	Bouira	
Ptr13	Blé tendre	Hiddab	Ibn Ziad	Constantine	
Ptr14	Blé dur	//	Ahnif	Bejaia	
Ptr15	Blé dur	//	Sortie d'El-ksser	Bejaia	
Ptr16	Blé tendre	Hiddab	Hamr - El Ain	Tipaza	
Ptr17	Blé tendre	Hiddab	Mouzaia	Blida	
Ptr18	Blé tendre	Hiddab	El-harrach (parcelles de l'ITGC- siège)	Alger	
Ptr19	Blé tendre	Hiddab	Oued Otmania	Mila	
Ptr20	Blé dur	Waha	Ain-Tinn	Mila	
Ptr21	Blé dur	//	El-Kseur	Bejaia	
Ptr22	Blé dur	//	Station de l'ITGC	Guelma	
Ptr23	Blé dur	//	Rentré d'laazougen	Tizi-Ouzou	
Ptr24	Blé dur	Vitron	Laadjel Hela(EAC94)	Tipaza	
Ptr25	Blé dur	//	Djendel	Ain Defla	
Ptr26	Blé dur	Waha	//	Mascara	
Ptr27	Blé tendre	Hiddab	Hamr-El ain	Tipaza	
Ptr28	Blé dur	Vitron	Hadjout	Tipaza	
Ptr29	Blé tendre	//	Station ITGC	Guelma	
Ptr30	Blé dur	//	On allant vers Azazga	Tiziouzu	
Ptr31	Blé dur	//	Ain Tabahraot	Sétif	
Ptr32	Blé tendre	Hiddab	Ain Sabra	Medea	
Ptr33	Blé tendre	Anza	Station de l'ITGC de Oued Smar	Alger	
Ptr34	Blé dur	Waha	Tagherzourt	Bouira	
Ptr35	Blé dur	Chen's	//	Bouira	
Ptr36	Blé dur	//	El-khroub	Constantine	
Ptr37	Blé dur	//	Ibn Ziad	Constantine	
Ptr38	Blé tendre	//	Berrouaghia	Medea	
Ptr39	Blé dur	Waha	Benihamiden	Constantine	
Ptr40	Blé dur	Vitron	Hadjout(EAC Fekairet)	Tipaza	
Ptr41	Blé dur	//	Azzeba LOTFI	Mila	
Ptr42	Blé tendre	Anza	Beni Slimane	Médéa	
Ptr43	Blé dur	//	Tadis	Constantine	
Ptr44	Blé dur	//	Ighzer Ouakar (Abadou)	Bejaia	
Ptr45	Blé dur	Bidi17	Gramem Gouda	Mila	
Ptr46	Blé dur	//	Vers Djendel (entrée de Ain Defla)	Ain-Defla	
Ptr47	Blé dur	Vitron	Berbouch(Hadjout)	Tipaza	

Ptr48	Blé tendre	Anza	//	Bouira	
Ptr49	Blé dur	Vitron	Sidi Rached	Tipaza	
Ptr50	Blé dur	Semeto	Station expérimentale de l'INA (El-Harrach)	Alger	
Ptr51	Blé dur	//	M'herza.	Ain Defla	
Ptr52	Blé rendre	Hiddab	Beni-Mestina	Constantine	
Ptr53	Blé tendre	Hiddab	Ain-Sbaa	Bouira	
Ptr54	Blé dur	//	Fredja	Tizi-ouzou	
Ptr55	Blé tendre	Hiddab	Station de l'ITGC de Oued-Smar	Alger	
Ptr56	Blé tendre	Vitron	Station de l'ITGC de Oued-Smar	Alger	
Ptr57	Blé dur	Chen's	Station de l'ITGC de Oued-Smar	Alger	
Ptr60	Lgata			Boumerdès	2004
Ptr61	Blé tendre	//	Oued-ElBerdj (à 10Km du centre de Bouira)	Bouira	Printemps 2007
Ptr62	Blé dur	//	Ain-Aloui	Bouira	
Ptr63	Blé tendre	//	Oued Elkhal (Benselman)	Bouira	
Ptr64	Blé dur	//	Limite de Elhachimia	Bouira	
Ptr65	Blé dur	//	Said Abid	Bouira	
Ptr66	Blé tendre	//	Ain Bessam	Bouira	
Ptr67	Blé dur	//	//	Tipaza	
Ptr68	Blé dur	//	//	Tipaza	
Ptr69	Blé dur	//	Zonne1	Boumedès	
Ptr70	Blé dur		Zonne2	Boumedès	
Ptr71	Blé dur		Zonne3	Boumedès	
Ptr72	Blé dur		Zonne4	Boumedès	
Ptr73	4 spores issues de la même lésion	Blé dur	//	Hamr El-Ani	
Ptr74		Blé dur	//	Hamr El-Ani	
Ptr75		Blé dur	//	Hamr El-Ani	
Ptr76		Blé dur	//	Hamr El-Ani	
Ptr77	3 spores issues de la même lésion	Blé tendre	Hiddab	Station de l'ITGC de Oued-Smar	
Ptr78		Blé tendre	Hiddab	Station de l'ITGC de Oued-Smar	
Ptr79		Blé tendre	Hiddab	Station de l'ITGC de Oued-Smar	
Ptr80	3 spores issues de la même lésion	Blé tendre	//	Ain Bessam	
Ptr81		Blé tendre	//	Ain Bessam	
Ptr82		Blé tendre	//	Ain Bessam	

Tableau III : Désignation, espèce hôte et origine des isolats provenant de la collection de l'université du Manitoba

Isolat	Origine géographique	Espèce hôte
NA-3-1	Ramdan Djamel-Skikda	Blé tendre
NA-8-2	Annaba	Blé tendre
NA 8-3	Annaba	Blé tendre
NA 7-1	Ramdan Djamel-Skikda	Blé dur
NA 3-3	Ramdan Djamel-Skikda	Blé dur
NA 2-1	Est du pays	Blé dur
NA-6-1	El-Hassar	Blé dur
NA 1-3	Ramdan Djamel	Blé dur
NA 7-4	Ramdan Djamel	Blé dur
NA 7-2	Ramdan Djamel	Blé dur
NA 7-3	Ramdan Djamel	Blé dur
NA 4-2	Est du pays	Blé dur
Souches de références		
Asc1 (Race1)	Canada	Blé tendre
86-124 (Race2)	Canada	Blé tendre
90-2 (Race4)	Canada	Blé tendre
Alg-3-24 (Race5)	Est de l'Algérie	Blé dur

Tableau IV: Type de réaction de la gamme différentielle à l'égard des huit races connues

Races Genotype	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
Glenlea	S-N	S-N	R	R	R	R	S-N	S-N
6B662	R	R	R	R	S-C/b	S-C/b	S-C/b	S-C/b
6B365	S-C/c	R	S-C/c	R	R	S-C/c	R	S-C/c
Salamouni	R	R	R	R	R	R	R	R
4B160	S-C	S-N	S-N	R	S-N	S-N	S-N	S-N
Coulter	S-N	S-N	S-N	R	S-N	S-N	S-N	S-N
4B1149	R	R	R	R	R	R	R	R

SN=sensible avec nécrose , SC_b= sensible avec chlorose induite par la toxine Ptr ToxB , SC_c= sensible avec chlorose induite par la toxine Ptr ToxC , R=résistance

Les graines des différentes variétés et lignées de blé utilisées, sont semées dans des pots de 15 cm de diamètre contenant de la terre, du sable et du terreau (2 :1 :1) à raison de 5 à 6 graines par pot. Au stade deux feuilles, seules 3 plantes par génotype sont conservées pour être inoculées, trois répétitions par traitement sont réalisées.

III. 2. Méthodes

III.2.1. Technique d'isolement monospore : Etant donné la variabilité possible de l'anamorphe *D. tritici-repentis*, tous nos isollements ont été réalisés à partir de cultures monospores. Celles-ci consistent à couper des feuilles infectées en fragments d'environ 1 cm au niveau de la lésion et de les déposer sur du papier filtre stérile humidifié avec de l'eau distillée stérile. Le tout est disposé dans une boîte de Pétri en verre préalablement stérilisée à 150°C.

Les boîtes sont incubées sous lumière continue à environ 20°C durant 18h puis à l'obscurité durant 24h à 15°C. Dans certains cas, les échantillons ont été incubés au laboratoire à la température ambiante (environ 22°C) durant 36 h à 48. Après l'apparition des conidies, celles-ci sont identifiées selon deux critères ; (i) la forme de la conidie et la nature de sa germination. En effet contrairement à d'autres genres, *Drechslera* est caractérisé par des conidies cylindriques pouvant germer à partir de toutes les cellules. (ii) La forme de la cellule apicale de la conidie, *D. tritici-repentis* est reconnue par l'extrémité de la cellule apicale en forme de tête de serpent. Lorsque les conidies sont identifiées, elles sont récupérées séparément et aseptiquement sous loupe binoculaire. Chaque conidie a été prélevée individuellement et déposée dans un milieu de culture PDA, dont la composition est comme suit : Pomme de terre 200 g, Glucose 20 g, Agar 20 g, eau distillée 1l.

III.2.2. Repiquage des isolats conservés en solution de glycérine: Les isolats fournis par le laboratoire de Phytopathologie de l'Université du Manitoba et conservés dans une solution de glycérol à -82°C ont été repiqués sur milieu V8-PDA (V8 150ml, Agar 10 g, PDA 10 g, CaCO₃ 3 g, H₂O 850 ml) et ce, afin de reconstituer des cultures monospores. A partir du tube, une quantité de spores congelées est prélevée aseptiquement et déposée dans une boîte de Petri contenant du milieu V8-PDA. Les boîtes sont incubées à 20°C et à l'obscurité jusqu'à la formation des colonies. Des disques de 1 cm sont alors prélevés et déposés sur un milieu de culture V8-PDA fraîchement préparé, à raison de 5 disques par boîte. Les disques prélevés sont déposés en prenant soin d'orienter la face sur laquelle le mycélium s'est développé vers le couvercle de la boîte. Les boîtes sont incubées pendant 18 h à 23°C sous une lumière blanche continue puis durant 24 h à 12°C à obscurité. Après formation des conidies, le disque est

prélevé avec une aiguille de dissection dans des conditions d'asepsie et frotté sur la surface d'un milieu V8-PDA afin de disperser les spores et faciliter leur prélèvement. Sous une loupe binoculaire les spores sont prélevées individuellement et déposées sur V8-PDA.

III.2.3. Conservation des isolats Les différents isolats obtenus par culture monospore sont ensuite conservés selon deux méthodes : dans des tubes à essai à 4°C sur milieu pauvre composé d'eau de pomme de terre à 20%, et sous forme de suspension de spores dans une solution de glycérine à 70% à - 82°C

III.2.4. Caractérisation morphologique des isolats : Dans le but de vérifier s'il existait une variabilité morphologique chez le *P. tritici-repentis*, nous avons caractérisé nos isolats selon les deux critères suivants ; les mensurations des spores et la croissance radiale des cultures à différentes températures.

III.2.4.1. Mensuration des conidies : Ces mesures ont été réalisées sur les conidies de 44 isolats de la collection : Ptr1, Ptr2, Ptr4, Ptr5, Ptr6, Ptr7, Ptr8, Ptr9, Ptr10, Ptr11, Ptr13, Ptr14, Ptr17, Ptr18, Ptr19, Ptr20, Ptr21, Ptr22, Ptr23, Ptr24, Ptr25, Ptr26, Ptr28, Ptr29, Ptr30, Ptr32, Ptr33, Ptr34, Ptr35, Ptr36, Ptr38, Ptr61, Ptr62, Ptr63, Ptr64, Ptr65, Ptr66, Ptr67, Ptr68, Ptr69, Ptr70, Ptr71, Ptr72. L'origine de ces isolats est indiquée dans les tableaux II.

Ce travail a consisté à mesurer grâce à un micromètre et sous microscope la longueur et le diamètre des conidies ainsi que le nombre de cloisons par conidie. Pour chaque isolat, 50 conidies ont été choisis au hasard, les moyennes des mesures réalisées ont été évaluées. Par la suite, et afin de vérifier la présence d'une éventuelle diversité, les valeurs obtenues ont subi une analyse de la variance.

III.2.4.2. Croissance radiale des cultures : Ces mesures ont été effectuées sur 60 isolats de la collection. Il s'agit de Ptr1, Ptr2, Ptr3, Ptr4, Ptr5, Ptr6, Ptr7, Ptr8, Ptr9, Ptr10, Ptr11, Ptr12, Ptr13, Ptr14, Ptr15, Ptr16, Ptr17, Ptr18, Ptr19, Ptr20, Ptr21, Ptr22, Ptr23, Ptr24, Ptr25, Ptr26, Ptr27, Ptr28, Ptr29, Ptr30, Ptr31, Ptr32, Ptr33, Ptr34, Ptr35, Ptr36, Ptr37, Ptr38, Ptr39, Ptr40, Ptr41, Ptr42, Ptr43, Ptr44, Ptr45, Ptr46, Ptr47, Ptr48, Ptr49, Ptr50, Ptr51, Ptr52, Ptr53, Ptr54, Ptr55, Ptr56, Ptr57, Ptr58, Ptr59, Ptr60, Ptr62, Ptr63, Ptr64, Ptr65, Ptr66, Ptr67, Ptr68, Ptr69, Ptr70, Ptr71, Ptr72. L'origine de ces isolats ainsi que leur origine géographique sont indiquées dans les tableaux II et III.

La croissance radiale des isolats a été déterminée sur milieu PDA, à l'obscurité et sous trois températures 20, 25 et 30°C. A partir de chaque isolat obtenu par culture

monospore, on prélève à la périphérie de la colonie un disque de 5 mm de diamètre que l'on place sens dessus dessous au centre d'une boîte de Pétri contenant un milieu PDA fraîchement préparé. La mesure de la croissance radiale exprimée en mm après 24 heures a été estimée à partir du moment où le mycélium commence à coloniser la périphérie du disque d'inoculation. Des mesures quotidiennes de la croissance radiale des colonies ont été réalisées pendant 5 jours sous une loupe binoculaire étalonnée. Quatre répétitions ont été effectuées pour chaque isolat. Les valeurs obtenues ont fait l'objet d'une analyse en composantes principales (ACP) afin de déterminer des groupes d'isolats présentant les mêmes caractéristiques de croissance mycélienne.

III.2.5. Détermination des races par inoculation artificielle: Les isolats qui ont fait l'objet de cette étude ont été les suivants :Ptr1, Ptr2,Ptr4, Ptr7, Ptr9, Ptr10, Ptr11, Ptr16, Ptr17, Ptr18, Ptr21, Ptr22, Ptr22, Ptr23, Ptr24, Ptr25, Ptr26, Ptr36, Ptr38, Ptr39, Ptr42, Ptr45, Ptr46, Ptr48, Ptr53, Ptr55, Ptr56, Ptr61, Ptr62, Ptr63, Ptr64, Ptr65, Ptr67, Ptr68, Ptr69, Ptr72, Ptr75, Ptr76, Ptr77, Ptr78, Ptr79, Ptr80, Ptr81, Ptr82, NA 3-1, NA 8-2, NA 8-3, NA 7-1, NA 3-3, NA 2-1, NA 6-1, NA 1-3, NA 7-4, NA 4-2, NA 7-2, NA 7-3. Ils ont été choisis pour deux raisons ; la première étant leur provenance des deux espèces blé dur et blé tendre. La seconde étant qu'ils représentaient la plupart des régions céréalières. L'origine de ces isolats ainsi que leur provenance géographique sont indiquées dans les tableaux II et III. L'inoculation a été réalisée selon la méthode décrite par Lamari et Bernier (1989c) modifiée.

III.2.5.1.Préparation de l'inoculum : Afin de produire l'inoculum, un explantât est prélevé à partir d'une culture jeune et déposé dans une boîte de Petri contenant un milieu V8-PDA. Les boîtes sont incubées durant 5 jours à l'obscurité et à 20°C, jusqu'à l'obtention d'une colonie d'environ 4 cm. Les colonies sont alors immergées d'eau distillée stérile et le mycélium est rabattu en utilisant le fond d'un tube à essai que nous faisons passer à la flamme. L'excès d'eau est par la suite éliminé et les cultures sont incubées sous une lumière blanche durant 18h et à 22°C, suivie de 24h dans l'obscurité à 12°C. Les conidies formées sont détachées en utilisant la boucle d'une anse d'inoculation, puis récoltées grâce à deux ou trois rinçages de la colonie avec de l'eau distillée stérile. La concentration est ajustée à 3×10^3 spores /ml et une goutte de Tween 20 est ajoutée pour chaque 250 ml d'inoculum.

III.2.5.2 Inoculation Les plantules de blé au stade 2 feuilles composant la gamme différentielle sont inoculées par pulvérisation de la suspension de conidies en utilisant un atomiseur. Les plants sont conservés sous condition d'humidité continue durant 24 h à

20°C et une photopériode de 8h de lumière et 16h d'obscurité. Ils sont par la suite déposés dans une chambre de culture sous les mêmes conditions de température et de photopériode. Pour chaque combinaison génotype/isolats, trois répétitions ont été réalisées. Lorsque l'expression des symptômes sur l'un des génotypes n'était pas concluante, l'inoculation était répétée deux à trois fois jusqu'à l'obtention de résultats dépourvus de toute ambiguïté ; cette situation a été rencontrée plus particulièrement pour la race 5 et 6. Il en a été de même pour les isolats ayant montré un profil de virulence inhabituel. Ainsi pour les isolats Ptr65, Ptr68, Ptr24, Ptr76 and NA 4-2, l'inoculation a été répétée deux à trois fois avec quatre répétitions pour chaque combinaison Isolat/génotype. La notation des symptômes est toujours réalisée au 6^{ème} jour après inoculation.

III.2.6. Inoculation de confirmation du nouveau profil de virulence : Afin de confirmer les réactions de la gamme différentielle induites par les isolats Ptr65, Ptr68, Ptr24, Ptr76 et NA 4-2, ces derniers ont été ré-inoculés ensemble dans un même dispositif. Durant cet essai, les souches de référence Asc1, 90-2 et Alg3-24 correspondants respectivement aux races 1, 4 et 5 ont été utilisées comme témoins. Quatre répétitions ont été réalisées pour chaque combinaison Isolat/génotype. La préparation de l'inoculum, les conditions d'inoculation et d'incubation des plants sont identiques à ceux des inoculations précédentes. Un huitième génotype a été introduit à la gamme différentielle, il s'agit de la variété Katepwa. Ainsi cinq blés tendres et trois blés durs ont été utilisés. La notation des symptômes a été réalisée après 6 jours d'inoculation et afin d'analyser l'évolution des symptômes, elle a été poursuivie jusqu'au 14^{ème} jour.

III. 2. 7. Production au laboratoire du téléomorphe *P. tritici-repentis* : La forme parfaite a été produite au laboratoire pour deux isolats Ptr65 et Ptr68. Ces derniers ont été choisis parmi un groupe d'isolats qui ont réuni Ptr65, Ptr68, Ptr24, Ptr76 and NA 4-2. Cet ensemble a montré lors des inoculations, un profil de virulence inhabituel et nouveau qui ne répond à aucune des 8 races déjà identifiées. Pour chacun des isolats choisis, le diamètre de 50 pseudothèces et la longueur de 50 asques a été mesurée. Des mensurations ont été également effectuées sur 50 ascospores ; celles-ci ont concerné la longueur, la largeur et le nombre de cloisons de chacune des ascospores.

Cette expérimentation est réalisée afin d'établir une corrélation entre l'anamorphe *Dreschlera tritici-repentis* et le téléomorphe *P. tritici-repentis*. Ceci permet de confirmer l'appartenance des isolats en question à l'espèce étudiée et d'éliminer toutes possibilités de confusion avec une autre espèce apparentée ; à savoir le *Pyrenophora bromi*.

A cet effet, des fragments de paille de 4 cm ont été autoclavés puis plongés dans une suspension de conidies dont la concentration a été ajustée à 1350 spores /ml. Les fragments de paille sont par la suite déposés dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée à 2%. Les boîtes sont alors incubées dans un premier temps à 18°C et à l'obscurité pendant 1 à 2 semaines, puis transférées à une température de 4°C en lumière continue pendant 7 semaines.

III.2.8. Amplification des gènes ToxA et ToxB : Afin de confirmer par une méthode moléculaire les résultats obtenus par l'inoculation artificielle lors de l'identification des races, nous avons amplifié les gènes ToxA et ToxB. En effet, dans le but de cerner l'étendue de toute la variabilité physiologique chez *P. tritici-repentis* ; une approche alternative a été proposée par Andrieu *et al.* (2007), lors de la détermination des races. Celle-ci repose sur la combinaison d'une caractérisation phénotypique basée sur les profils de virulence obtenus par inoculation de la gamme d'hôte différentielle et une caractérisation génotypique basée sur l'amplification des gènes de virulence.

III.2.8.1. Culture des isolats en milieu liquide : Les 55 isolats de *P. tritici-repentis* précédemment inoculés, ont été cultivés dans un milieu FRIES dont la composition pour 1 litre d'eau distillée, est la suivante :

• NH ₄ Tartrate d'ammonium	5 g
• NH ₄ NO ₃ Nitrate d'ammonium	1 g
▪ MgSO ₄ 7H ₂ O Sulfate de Magnésium Hydraté	0,5 g
▪ KH ₂ PO ₄ Potassium phosphate monobasique	1,3 g
▪ KH ₂ PO ₄ Potassium phosphate dibasique	2,6 g
▪ Saccharose	30 g

Cette composition est additionnée de 2 ml d'une solution d'éléments minéraux composée de :

• Chlorure de Lithium	167 mg
• Chlorure de Cuivre	107 mg
• Acide Molybdique	32 mg
• Chlorure de Manganèse	72 mg
• Chlorure de Cobalt	80 mg
• H ₂ O	1l

Des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml du milieu FRIES ont étéensemencés par une solution de conidies de chacun des 55 isolats étudiés, puis incubées à 20°C à l'obscurité durant 10 jours. Les cultures mycéliennes sont récoltées par filtration sous vide

dans des conditions d'asepsie, congelées dans de l'azote liquide, puis lyophilisées durant 48 h à 72 h.

III.2.8.2. Extraction de l'ADN : L'extraction de l'ADN a été réalisée en utilisant le kit « Wizard genomic DNA purification kit » de Promega, selon le Protocole recommandé et modifié. 200 mg de mycélium lyophilisé de chacun des isolats ont été pesés dans un tube Ependorf de 2 ml puis broyés dans de l'azote liquide en utilisant un pilon Eppi, jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. A cette dernière est ajouté 600 µl de la solution de lyse, puis le contenu du tube est homogénéisé par un passage au vortex. Les tubes sont incubés à 65°C dans un bain Marie durant 15 mn. Par la suite, 3 µl d'ARNase sont ajoutés au lysat cellulaire ; les échantillons sont mélangés en inversant les tubes et incubés à 37°C durant 15 mn.

La solution de précipitation des protéines est ajoutée au lysat à raison de 200 µl par tube ; ces derniers tubes sont vortexés durant 20 secondes puis centrifugés durant 10 mn à 13 000 g. Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube et un volume égal d'une solution de phénol/chloroforme (50 :50) est ajouté. Le contenu des tubes est homogénéisé par inversion des tubes, puis ces derniers sont centrifugés à nouveau à 13000 g durant 10 mn. Le surnageant est récupéré et un volume égal de chloroforme lui est ajouté. Après une centrifugation à 13000 g durant 10 mn, le surnageant est pipeté délicatement et transféré dans un nouveau tube dans lequel l'ADN sera précipité avec un l'Ethanol.

La précipitation de l'ADN a consisté dans un premier temps en l'ajout au surnageant transféré lors de l'étape précédente 600 µl d'isopropanol froid, les tubes sont homogénéisés en les inversant délicatement, puis ils sont incubés à 4°C durant 30 mn. Dans un second, temps les tubes sont centrifugés à 13000 g durant 10 mn et le culot formé de l'ADN précipité est lavé deux fois avec de l'Ethanol à 70%. Après une dernière centrifugation les tubes sont déposés sur du papier absorbant dans une étuve à 37°C afin de permettre l'évaporation totale de l'Ethanol.

Après le séchage de l'ADN, celui-ci est dissout dans 100 µl de la solution de réhydratation en incubant les tubes au bain Marie à 65°C durant 1h.

III.2.8.3. Détermination quantitative de l'ADN extrait : La quantité d'ADN est déterminée par des lectures de la densité optique au spectrophotomètre. Le principe de ce dosage est basé sur le fait qu'une unité de la densité optique à 260 nm est équivalente à 50 µg d'ADN par ml de solution. La quantification a consisté à introduire dans un tube Eppendorf de 2 ml, 5 µl d'ADN et 695 µl de tampon TE (annexe 1). Après

agitation, les échantillons sont passés au spectrophotomètre et la lecture de la densité optique est réalisée à une longueur d'onde de 260 nm.

III.2.8.4. Détermination qualitative de l'ADN extrait : La qualité de l'ADN est vérifiée par spectrophotométrie et par un test gel. Les mesures spectrales ont concerné l'évaluation de rapport Do260/Do280. Cette valeur doit être comprise entre 1,8 et 2 ; un rapport inférieur à 1,8 indique la présence de protéines, tandis qu'un rapport supérieur à 2 indique la présence d'ARN. Lorsque les valeurs obtenues se révélaient au-delà de l'intervalle recommandé, certaines étapes de l'extraction ont été répétées.

Le test gel a consisté en la réalisation d'une électrophorèse sur un gel d'agarose de 0,8% dans une solution de TBE (annexe 2), le flacon est mis au four micro-onde jusqu'à l'obtention d'une solution limpide. Après refroidissement du flacon, 3 µl de Bromure d'Ethidium sont ajoutés puis le gel est coulé.

III.2.8.5. Mélange réactionnel et cycle d'amplification : Les PCR ont été réalisées sur les ADN des 55 isolats ; la concentration des échantillons a été ajusté à 100 ng /µl. L'ADN extrait à partir de la souche ASC1 représentant la race 1 a été utilisé comme témoin positif de la présence de ToxA , alors que celui extrait à partir de Alg-3-24 représentant la race 5 a été utilisé comme témoin positif indiquant la présence du gène ToxB . Les conditions d'amplification sont les suivantes :

III.2.8.5.1. Le milieu réactionnel : Le protocole adopté pour chaque réaction de PCR dans un volume réactionnel de 25 µl, est indiqué dans le tableau V ci-dessous :

Tableau V : Composition du volume réactionnel utilisé lors des amplifications

Composants	Mélange d'amplification	Volume	concentration finale
1	Tampon de PCR (10x)	2,5µl	x1
2	dNTP (25mM)	0,2 µl	0,2mM
3	MgCl ₂ (50mM)	1,0 µl	2mM
4	Amorce F (20pmol/µl)	0,25 µl	5pmol
5	Amorce R (20pmol/µl)	0,25 µl	5pmol
6	Taq polymérase (5U/µl)	0,5 µl	2,5U
7	ADN	1 µl	100ng
8	H ₂ O	19,3	

III.2.8.5.2. Les amorces utilisées : Les amorces ToxA1 et ToxA2 ont été utilisées pour amplifier le gène ToxA (Fig. 9) soit une séquence de 294 pb. Les amorces ToxB1 et

ToxB4 ont été utilisées pour amplifier une séquence du gène ToxB de 310 pb, existant chez la race 5 (Fig. 10) et l'homologue de ToxB présent chez la race 3 (Fig. 11). Le choix de ces amorces réside dans le fait qu'elles permettent l'amplification d'une large séquence de la région codante ; les séquences des amorces sont indiquées dans le tableau VI.

Tableau VI : Séquences des deux couples d'amorces utilisées.

Amorces	Séquences
ToxA1	5' – GTC ATGCGTTCTATCCTCG-3'
ToxA2	5'- CCTATAGCACCAGGTCGTCC-3'
ToxB1	5'- GACTACCATGCTACTTGCTGTG-3'
ToxB2	5'- CCCTATACCTAATGTAGGGC-3'

III.2.8.5.3. Cycle d'amplification : le programme de PCR employé a été choisi après une étape d'optimisation des températures nécessaires aux hybridations des amorces ; le programme est le suivant :

Une dénaturation primaire à 95°C pendant 3 mn, est suivie de 30 cycles comportant les trois phases d'amplification : une dénaturation à 95°C pendant 45 secondes, une hybridation des amorces à 50°C durant 30 secondes et une élongation à 68°C pendant 1mn. Le programme est achevé par un traitement des échantillons à 72°C pendant 10 secondes. Par souci de reproductibilité de nos résultats la PCR a été réalisée trois à quatre fois pour chaque échantillon.

III. 2. 8. 5. 4. Révélation des fragments d'ADN amplifiés : Les fragments amplifiés sont visualisés par électrophorèse, sur gel d'agarose à 1,5% préparé dans du TAE (Annexe 3). Les échantillons amplifiés ont été mélangés à 1/5 du volume final avec du tampon de charge (Annexe 4), puis déposés au niveau des puits composés dans le gel d'agarose. La migration est effectuée dans un tampon TAE (Annexe 3) sous un courant constant de 90 volts, jusqu'à ce que le front de migration arrive à 1 cm de l'extrémité du gel. Le bromure d'Ethidium incorporé au gel d'agarose lors de sa préparation, permet de visualiser sous lumière Ultraviolette, les fragments amplifiés sur un écran.

III. 2. 9. Caractérisation moléculaire des isolats ayant le profil de virulence nouveau : Les isolats Ptr24, Ptr65, Ptr68 et Ptr76 ayant montré un profil de virulence différent de ceux des huit races connues, celui-ci indique l'absence de production des trois toxines PtrToxA, PtrToxB et PtrToxC. Ceci nous a amené à émettre l'hypothèse selon laquelle il y aurait une absence des gènes contrôlant leur production ou leur inhibition.

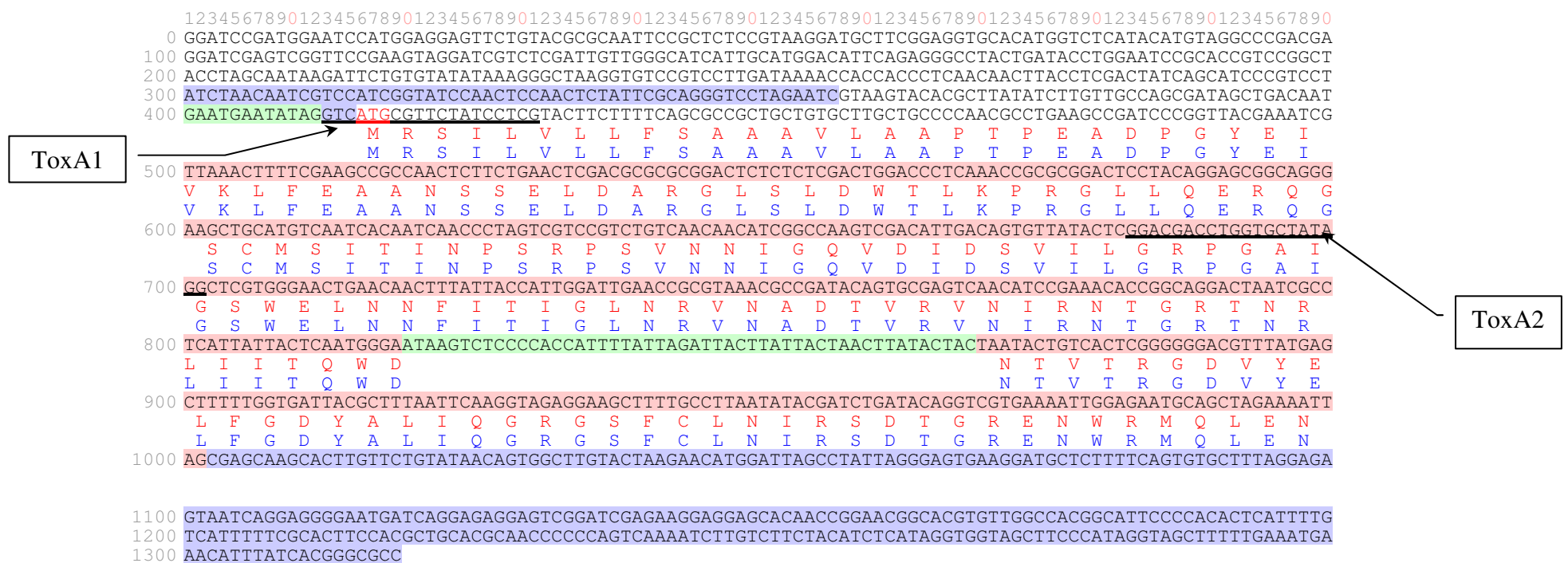


Figure 9 Séquence nucléotide du gène ToxA, séquence de la protéine correspondante (GenBank AF004369.1) et positions d'hybridation des amorces ToxA1 et ToxA2. Noter que la séquence amplifiée correspond à environ la moitié d'un exon à l'intérieur de la région codante.

1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890

0 AGCAGGCAGTTTAGTATCAGGGTCCAGGTTGCAGCCATGTTAGCTGATCCGCCTCGATCCTACTTCGGCCTTACGTGCACGAGAGCACATAGATCGCGAC

100 AGCACCATGAGGAACAACACGGGACAATAAATGATCAGGAACATCAAAATCTATCTAATATCTAATCTGATCTAACATTACTATACCTCCTTTTCATTA

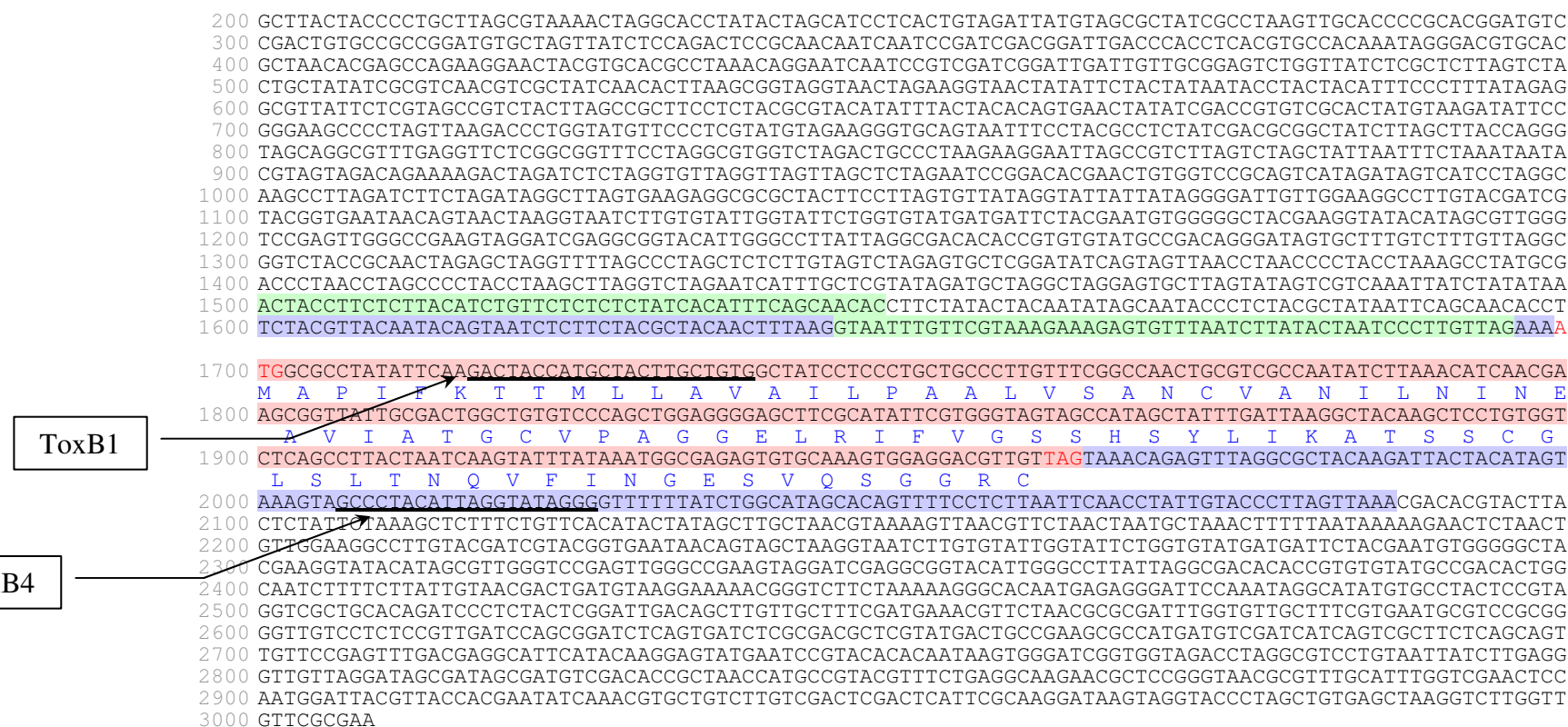


Figure 10 : Séquence nucléotidique du clone ToxB3K1, contenant le gène ToxB (nucléotides : 1494-2087), séquence de la protéine correspondante (GenBank AY242115.1) et positions d'hybridation des amorces ToxB1 et ToxB4. Noter que la séquence amplifiée correspond à presque la totalité de la région codante.



Figure 11 : Séquence nucléotide du gène ToxB à partir de la race 3, souche D308, séquence de la protéine correspondante (GenBank AY243461.2) et positions d'hybridation des amorces ToxB1 et ToxB4. Noter que la séquence amplifiée correspond à plus de la région codante.

Parmi les trois gènes, les séquences de ToxA et ToxB responsables successivement de la production de PtrToxA et PtrToxB sont connues. L'approche choisie a consisté à rechercher la présence des gènes ToxA et ToxB via l'amplification des régions codantes (ou d'une partie des régions codantes) au niveau des deux gènes. Les produits d'amplification résultants pour chaque gène ont été séquencés et analysés. La forme allélique *toxb* qui est un homologue de ToxB existant chez la race 4 qui ne produit aucune toxine a été également recherché. Par ailleurs, nous avons également recherché la présence du gène CHS-1, codant pour la chitine synthétase 1, et ce afin d'avoir un contrôle positif de la présence de l'ADN fongique.

III. 2. 9. 1. Matériel Biologique : Il est composé de quatre isolats de *P. tritici-repentis* ; Ptr24, Ptr65, Ptr68 et Ptr76, ainsi que des ADN de cinq souches de référence fournis par l'Unité de Phytopathologie de l'Université Catholique de Louvain-La neuve, Belgique : Pti2, 86-124, 331.9, 90.2 et DW7 correspondant respectivement aux races 1, 2, 3, 4 et 5. Ces isolats étudiés ont été cultivés de la même façon qu'indiquée précédemment dans le chapitre III.2.8

III. 2. 9. 2. Extraction de l'ADN : A cet effet, 200 mg de mycélium lyophilisé de chacun des isolats ont été pesés dans un tube Ependorf de 2 ml auquel est ajouté 600 µl de la solution de lyse (50Mm Tris-HCl pH=7,4, 50Mm EDTA, 3%SDS), puis le contenu du tube est homogénéisé par un passage au vortex et broyé en utilisant un broyeur mécanique. Les tubes sont incubés à 65°C dans un bain Marie durant 15 mn, puis est ajouté 1µl (0,1mg) d'ARNase lysat cellulaire. Les échantillons sont mélangés en inversant les tubes et incubés à 37°C durant 15 mn. La suite de la procédure est conforme à celle décrite dans le chapitre III.2.8.2.

III. 2. 9. 3. Détermination de la quantité et de la qualité de l'DNA : La concentration de l'ADN a été déterminée à l'aide d'un nano-drop. A cette effet 2 µl d'ADN ont été utilisés, mais au préalable, l'appareil a été équilibré avec 2 µl d'eau distillée stérile, alors que 2 µl de TE ont été utilisés pour réaliser le blanc avant d'entamer nos mesures. La qualité de l'ADN extrait a été vérifiée selon la procédure décrite aux paragraphes III.2.8.

III. 2. 9. 4. Recherche des gènes ToxA, ToxB et *toxb* par PCR : La présence des gènes en question a été vérifiée par PCR, en utilisant les amorces développées par d'Andri et *al.* (2007) pour la PCR multiplexe. Cette dernière approche a été modifiée en PCR simplexe qui nous permet une purification des amplicons et leur séquençage.

III. 2. 9. 4. 1. Mélange réactionnel : Le protocole adopté pour chaque réaction PCR dans un volume de 50 µl, comme indiqué dans le tableau VII ci-dessous :

Tableau VII : Composition du volume réactionnel utilisé lors des amplifications

Composants	Mélange d'amplification	Volume	concentration finale
1	Tampon de PCR (5x)	10 µl	1x
2	dNTP (10mM)	1,5 µl	3x10 ⁻¹ mM
3	Mgcl ₂ (25mM)	5,0 µl	2,5 mM
4	Amorce F (20µmol/µl)	1 µl	20µmol
5	Amorce R (20µmol/µl)	1 µl	20µmol
6	Taq polymérase (5U/µl)	0,25 µl	1,25U
7	ADN	2 µl	25 ng
8	H ₂ O	29,25 µl	/

III. 2. 9. 4. 2. Les amorces utilisées : Le choix de ces amorces réside dans le fait qu'elles permettent l'amplification d'une large séquence de la région codante. Les séquences des amorces sont indiquées dans le tableau VIII

Tableau VIII: Séquences des couples d'amorces utilisées.

Locus	Amorce	Sequence	Sources
<i>ToxA</i>	TA51F	5'-GCGTTCTATCCTCGTACTTC-3'	Andri et al.(2007)
	TA52R	5'-GCATTCTCCAATTTTCACG-3'	
<i>ToxB</i>	TB71F	5'-GCTACTTGCTGTGGCTATC-3'	Andri et al.(2007), Martinez et al. (2001)
	TB60R	5'-ACTAACAACGTCCTCCACTTTG-3'	
<i>Toxb</i>	TB58R	5'-TATGAATGATTGACTGGGGTTA-3'	Martinez et al. (2001) Andri et al.(2007)
<i>CHS-1</i>	CHS-79F	5'-TGGGGCAAGGATGCTTGAAGAAG-3'	Carbone et Kohn (1999)
	CHS-354R	5'-TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG-3'	Carbone et Kohn (1999)

Le couple d'amorces TA51F/TA52R a été utilisé pour amplifier le gène *ToxA* et plus particulièrement une séquence de 573 pb correspondant à presque la totalité de la région codante. Les amorces TB71F/ TB60R amplifient *ToxB* identifié chez la race 5 et l'homologue de *ToxB* présent chez la race 3. Les amorces TB71F/TB58R amplifient *toxb* connu chez la race 4. Ces deux derniers couples d'amorces permettent d'amplifier une séquence de 232 pb à l'intérieur de la région codante. Enfin le couple CHS-79F/CHS-354R amplifie le gène codant pour la chitine synthétase 1.

III. 2. 9. 4. 3. Cycles d'amplification : Le programme utilisé après optimisation du nombre de cycles comprend une dénaturation primaire à 94°C pendant 1 mn, suivie de 35 cycles comportant les trois phases d'amplification ; une dénaturation à 94°C pendant 45 secondes, hybridation des amorces à 58°C durant 30 secondes et une élongation à 72°C pendant 1 minute. Le programme est achevé par un traitement des échantillons à 72°C pendant 7 minutes. Par souci de reproductibilité de nos résultats la PCR a été réalisée deux à trois fois pour chaque échantillon.

III. 2. 9. 4. 4. Révélation des fragments d'ADN amplifiés : Les fragments amplifiés sont visualisés par électrophorèse, sur gel d'agarose à 1,3%. Préparé dans du TBE (Annexe 2), 10 µl de chaque échantillon amplifié ont été mélangés à 5 µl de tampon de charge (Annexe 3), puis déposés au niveau des puits composés dans le gel d'agarose.

La migration s'est effectuée dans un tampon TBE sous un courant constant de voltage 120 Volts, jusqu'à ce que le front de migration ait atteint 1cm de l'extrémité du gel. Sous l'effet de la lumière ultraviolette, le bromure d'éthidium incorporé au gel d'agarose permet de révéler les bandes sur le gel .

III. 2. 9. 4. 5. Purification des produits d'amplification : Les ADN destinés à être séquencés sont purifiés selon la nécessité et le produit à purifier ; (i) Bench Protocol : QIAquick Gel Extraction Microcentrifuge and Vacuum Protocol de QIAGEN pour la purification à partir de bandes découpées sur le gel (ii) Protocole pour purification et concentration de fragments d'ADN à partir de volume réactionnel de B-Bridge International.

A) Protocole 1 : Les bandes recherchées observées sur le gel d'agarose sont découpées délicatement à l'aide d'un scalpel stérile et introduites séparément dans un tube Eppendorf de 2 ml (pour chaque bande un scalpel différent a été utilisé). La bande est pesée puis trois volumes de tampon QG sont ajoutés pour chaque volume de gel (100 mg =100 µl). Les tubes sont incubés à 50°C pendant environ 10 mn jusqu'à ce que le gel soit complètement dissous. Afin de favoriser la dissolution de la gélose dans les tubes, ceux-ci sont vortexés chaque 2 à 3 mn durant l'incubation. La solution obtenue est déposée sur la colonne de purification installée dans un tube Eppendorf, les tubes sont alors centrifugés durant 1 mn à 13 000 tours / mn (=17900 g) jusqu'au passage total de la solution à travers la colonne. Par la suite, 0,5 ml de tampon QG sont déposés sur la colonne et les tubes sont à nouveau centrifugés comme précédemment. Afin de rincer complètement la colonne, 0,75 ml de tampon PE y sont déposés et une nouvelle centrifugation durant 1 mn à 13000 t/mn est réalisée. Enfin, la colonne de purification est

déposée dans un tube de 1,5 ml et l'ADN est élué en déposant sur la colonne 50 µl de tampon EB (10 Mm Tris-Cl, pH 8,5). L'ADN est alors récupéré après une nouvelle centrifugation comme précédemment.

B) Protocole 2 : Afin de purifier directement le produit de PCR, nous avons ajouté à 40 µl de produit PCR, 250 µl de tampon de liaison (Binding Buffer). Par la suite l'échantillon est déposé sur la colonne installée dans un tube de 1,5 ml. Les tubes sont alors centrifugés durant 3 mn à 12000 tours/mn (13400g). L'élution de l'ADN a été réalisée après le dépôt de 15 µl d'eau distillée stérile au centre du filtre de la colonne de purification. Après une centrifugation d'une minute à 10000 tours/mn (9300 g), l'ADN est récupéré dans les tubes.

III. 2. 9. 4. 6. Quantification de l'ADN contenu dans les produits d'amplification purifiés : Les produits PCR purifiés ont fait l'objet d'une quantification par deux méthodes : (i) par spectrophotométrie et (ii) par comparaison à un marqueur de poids moléculaire de concentration connue.

A) Dosage spectrophotométrique : Le dosage a été réalisé à l'aide d'un nano-drop, en utilisant 2µl ADN purifié a été utilisé.

B) Comparaison avec un marqueur de poids moléculaire : Le marqueur 100 pb ladder a été utilisé. A cet effet, pour chaque échantillon issu d'amplification des deux gènes ToxA et ToxB, 1 µl d'ADN additionné de 5 µl d'eau distillé ont été mélangés à 2 µl de tampon de charge. Les ADN ainsi préparés ont été déposés dans un gel d'agarose de 1,2% et la migration électrophorétique a été réalisée à 120 Volt.

III. 2. 9. 5. Séquençage des produits d'amplification : Les fragments amplifiés par PCR pour les gènes ToxA et ToxB des quatre isolats ont été séquencés pour les deux brins ; le brin codon et le brin anti-sens. Les deux brins sont séquencés afin d'authentifier la séquence obtenue et de s'assurer de l'absence d'ambiguïté sur l'identité de même un seul nucléotide. A cet effet les échantillons d'ADN ont été conditionnés comme suit : pour chaque produit d'amplification un volume de 10 µl contenant entre 20 et 40 ng d'ADN et 5 µm de primer ont été préparés. Afin de réaliser le séquençage des deux brins, deux tubes ont été préparés pour chaque amplicon ; le premier a été additionné de l'amorce sens(F) et le second de l'amorce anti-sens(R). Ainsi 16 échantillons ont été séquencés.

III. 2. 9. 6. Analyse des séquences obtenues : Les séquences ont été extraites sous format FASTA à partir des chromatogrammes en utilisant le programme Chromas 2.33.

Les séquences obtenues ont fait l'objet d'un alignement multiple en utilisant le programme Clustalw.

III. 2. 9. 6. 1. Création d'une base de données pour ToxA et ToxB : Une recherche de séquences correspondantes à ToxA et ToxB a été réalisée sur NCBI et ce afin de réunir une base de données pour chacun des deux gènes.

III. 2. 9. 6. 2. Analyse des séquences via Clustalw : Clustalw est un programme d'alignement multiple de séquences d'ADN ou de protéine. Ainsi après l'obtention des compléments de l'inverse des séquences anti-sens via le programme « DNA Sequence Reverse Complement Tool », un alignement multiple a été réalisé sur la totalité des séquences à travers l'interface graphique de Geneious Basic 5.3.6. Les séquences alignées sont celles des brins codants, celles des brins anti-sens ainsi que de la séquence de référence. Cette comparaison a été effectuée aussi bien pour ToxA que pour ToxB. Suite à cette première analyse, les séquences ont été corrigées des éventuelles erreurs de séquençage. La correction est basée sur l'analyse visuelle des différences observées sur chacune des séquences, et ce par comparaison à la séquence de référence. Une différence ne peut être validée comme mutation que si elle se répète aussi bien sur le brin sens que sur le brin anti-sens. Dans le cas contraire et après confirmation par analyse visuelle du chromatogramme, la base différente ou manquante est remplacée ou ajoutée à la position adéquate.

III. 2. 10. Analyse de la diversité génétique des isolats *P. tritici-repentis* par marqueurs AFLP : Cette méthode permet une investigation sur le génome dans sa totalité, les produits obtenus sont d'une grande spécificité et les données génotypiques qui en résultent sont reproductibles. La démarche entreprise pour sa mise au point et son adaptation au matériel génétique du *P. tritici-repentis* est imprégnée du protocole de Vos et *al.*, (1995). Les différentes étapes de l'approche choisie sont résumées sur la figure 12.

III. 2. 10. 1. Matériel fongique : Cette analyse a concerné 61 isolats de *P. tritici-repentis* provenant des différentes régions céréalière du pays. Pour 42 isolats la race avait été déterminée, ils appartiennent à différentes races. Les isolats ayant fait l'objet de cette étude sont : Ptr2, Ptr12, Ptr24, Ptr36, Ptr46, Ptr67, Ptr56, Ptr79, Ptr4, Ptr16, Ptr25, Ptr37, Ptr48, Ptr69, Ptr57, Ptr80, Ptr6, Ptr17, Ptr26, Ptr38, Ptr49, Ptr72, Ptr61, Ptr81, Ptr7, Ptr18, Ptr30, Ptr39, Ptr50, Ptr73, Ptr62, Ptr82, Ptr8, Ptr19, Ptr31, Ptr40, Ptr51, Ptr75, Ptr63, Ptr68, Ptr9, Ptr21, Ptr32, Ptr42, Ptr52, Ptr76, Ptr64.

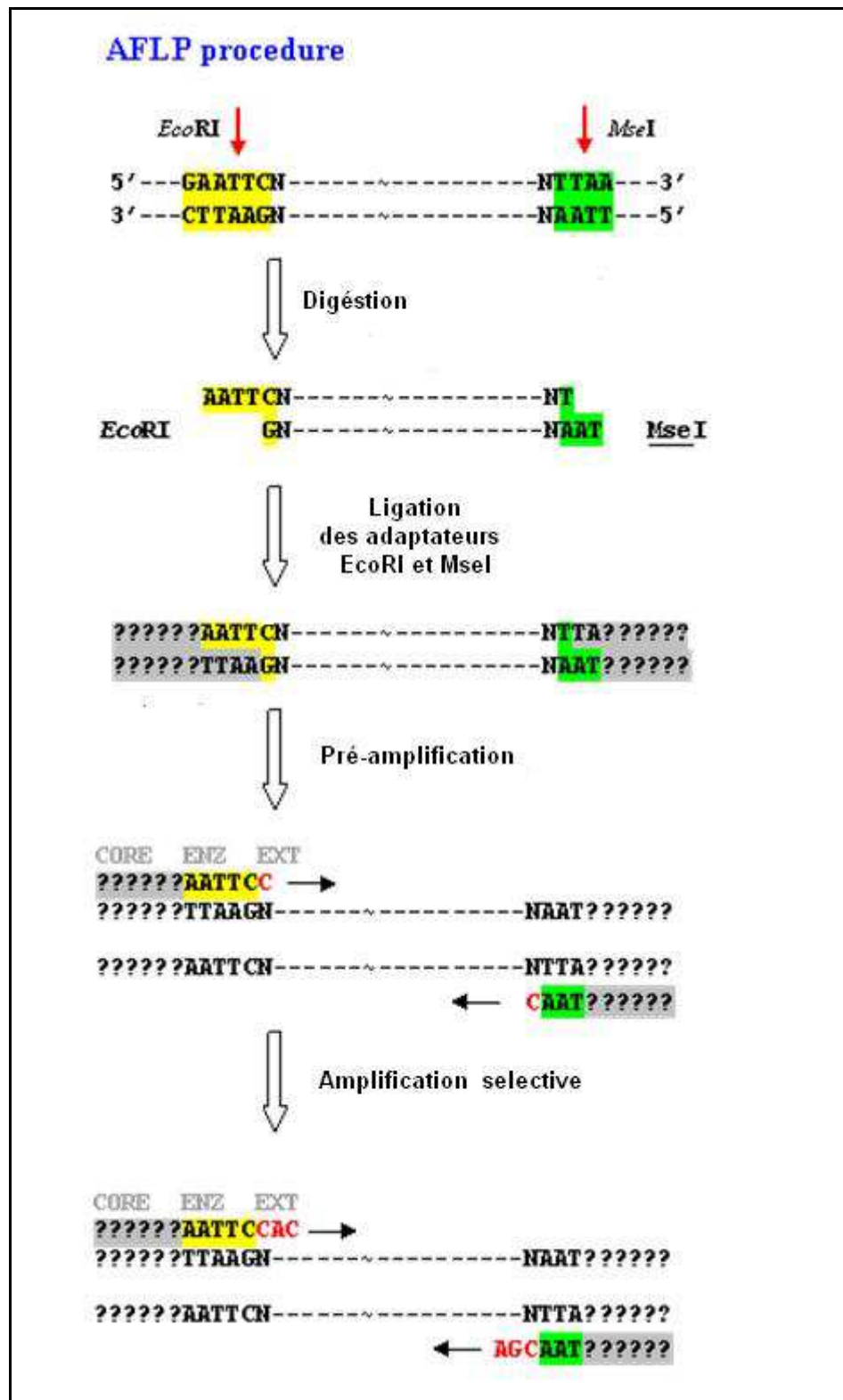


Figure 12 : Représentation schématique du protocole AFLP en utilisant les enzymes de restriction EcoRI et Mse

III. 2. 10. 2. Extraction de l'ADN : La culture des isolats a été réalisée comme il est indiqué au chapitre III.2.8.1. L'ADN a été extrait selon la méthode décrite dans le paragraphe III.2.9.3. La concentration des différents échantillons a été ajustée à 25 ng/μl.

III. 2. 10. 3. Evaluation quantitative et qualitative de l'ADN : La quantité et la qualité de l'ADN ont été évaluées par électrophorèse sur un gel d'agarose de 0,8% préparé comme indiqué au chapitre III.2.8.4. L'intégrité de l'ADN et l'absence de dégradation sont vérifiées par l'absence de Smear, alors que la quantité a été déduite suite à la comparaison de l'intensité des bandes obtenues avec celle d'un marqueur Lambda (25 ng/μl). L'évaluation a été effectuée deux fois avant et après l'ajustement de la concentration à 25 ng/μl.

III. 2. 10. 4. Digestion de l'ADN : 250 ng d'ADN génomique ont été digérés par deux enzymes de restriction : MseI et EcoRI. La première coupe l'ADN fréquemment, elle reconnaît le site de restriction TTAA, alors que la seconde coupe l'ADN moins fréquemment et reconnaît le site de restriction GAATTC. Cette réaction a été réalisée dans un volume réactionnel de 20 μl dont les composants et concentrations correspondant à chaque élément sont indiqués dans le tableau IX ci-dessous.

Tableau IX : Composition du mélange réactionnel pour la digestion enzymatique

Composants	Mélange réactionnel	Volume (μl/échantillon)	concentration final
1	DNA	10	250ng
2	Buffer (OPA)	2	1X
3	MseI (10U/μl)	0,5	5U
4	EcoRI (10U/μl)	0,3	3U
5	BSA	0,5	
8	H ₂ O	6,7	

Pour l'ensemble des échantillons, un mix a été préparé puis celui-ci a été réparti à raison de 10 μl par échantillon, les échantillons d'ADN ainsi préparés ont été incubés à 37°C pendant 3h.

III. 2. 10. 5. Ligation des produits digérés aux adaptateurs : Des adaptateurs de séquences connues complémentaires aux extrémités générées suite à la digestion ont été ajoutés de part et d'autre des fragments d'ADN. A partir de l'ADN génomique digéré, 10 μl ont été utilisés. Le volume d'ADN indiqué a été additionné à 2,5 μl du mélange réactionnel

de la ligation (Tab. X) contenant les adaptateurs spécifiques pour les deux endonuléases. Les échantillons sont ensuite incubés à 37°C pendant toute la nuit.

Tableau X: Composition du mélange réactionnel pour la ligation des adaptateurs à l'ADN digéré

Composants	Mélange réactionnel	Volume (µl/échantillon)	concentration finale
1	ADN	10	/
2	Tampon (OPA)	0,25	1X
3	Adaptateur de MseI	0,25	50pmol
4	Adaptateur de EcoRI	0,25	5pmol
5	T4-DNA	0,1	1U
6	ATP	0,25	10mM
7	H ₂ O	1,4	/

III. 2. 10. 6. Vérification de la qualité des réactions de digestion-ligation : A cet effet une électrophorèse sur gel d'agarose de 1% préparé dans une solution de TBE est réalisé. Pour chaque isolat étudié, 2 µl de tampon de charge ont été ajoutés à 5 µl de l'ADN puis déposés sur le gel. Les produits des deux réactions sont révélés sur le gel d'agarose grâce au BET incorporé.

III. 2. 10. 7. Amplification d'ADN par PCR : Les bouts ajoutés (adaptateurs) ont constitué un Template pour la fixation des amorces lors des amplifications. En effet les amorces reconnaissent le site de restriction associé à l'adaptateur.

III. 2. 10. 7. 1. Pré-amplification: L'ADN issu de la réaction précédente (ligation des adaptateurs) a été dilué cinq fois avant son utilisation lors de cette amplification. Les amorces utilisées sont complémentaires aux adaptateurs, aucune base arbitraire n'a été ajoutée. Les séquences des amorces donc ont été les suivantes :

- ✓ Amorce *EcoRI* : 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'
- ✓ Amorce *MseI* : 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'

La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume de 20 µl composé de 3 µl d'ADN et de 17 µl de mix réactionnel préparé comme indiqué dans le tableau XI.

Tableau XI : Composition du volume réactionnel utilisé lors des pré-amplifications

Composants	Mélange d'amplification	Volume	concentration	finale
1	Tampon de PCR (10x)	2µl		1x
2	dNTP (2 mM)	2,5 µl		0,25 mM
3	Amorce MseI	1 µl		50ng
4	Amorce EcoRI	1 µl		50ng
5	Taq polymérase (5U/µl)	0, 2 µl		1U
6	H ₂ O	10,3 µl		
7	ADN	3 µl		

Le programme utilisé est le suivant : Une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, hybridation des amorces à 60°C durant 30 secondes et une élongation à 72°C pendant 1minute. Enfin le programme est achevé par un traitement des échantillons à 72°C pendant 1 minute.

La qualité des amplifications a été vérifiée selon la méthode décrite au chapitre II.

2. 10. 7. L'ADN amplifié de chaque isolat à été mélangé à raison de 4 µl avec 1µl de tampon de charge, puis déposé sur le gel. Il est révélé par la suite grâce au BET.

III. 2. 10. 7. 2. Amplification sélective: Les produits issus des PCR réalisées lors de l'étape de pré-amplification ont été dilués 5 fois avant leur utilisation. Durant cette deuxième étape d'amplification, dite sélective, les mêmes amorces ont été utilisées. Toutefois ces dernières sont prolongées à l'extrémité 3' de quelques nucléotides arbitraires (1 à 3). Les amorces ont été donc utilisées sous la forme suivante :

- ✓ Amorce *EcoRI* : 5'-GACTGCGTACCAATTC-3' + extension de séquence
- ✓ Amorce *MseI* : 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3' + extension de séquence

L'amplification est réalisée chaque fois par un couple d'oligonucléotides dont l'un est marqué par un fluorochrome, de façon à détecter le produit de la PCR par fluorescence sur un séquenceur automatique. Ainsi dans le présent travail, les amorces spécifiques de l'enzyme *EcoRI* utilisées sont marquées à leur extrémité 5' par l'un des trois fluorochromes NED, VIC ou FAM, dont la fluorescence est successivement dans le jaune, vert et bleu comme indiqué dans le tableau XII.

Tableau XII : Type de fluorochromes par lesquels les amorces spécifiques d'EcoR1 sont marquées

Amorces	Fluorochrome	Type de fluorescence	Amorces	Fluorochrome	Type de fluorescence
E32	VIC	Dans le vert	E37	VIC	Dans le vert
E33	VIC	Dans le vert	E40	NED	Dans le jaune
E35	FAM	Dans le bleu	E41	VIC	Dans le vert
E36	NED	Dans le jaune	E42	FAM	Dans le bleu

Cette étape permet de n'amplifier que les fragments complémentaires des bases arbitraires entraînant ainsi une réduction du nombre de fragments amplifiés. Dans un premier temps 78 combinaisons d'amorces spécifiques à l'enzyme EcoRI et Mse ont été testées sur quatre échantillons d'ADN. Ceci a permis de sélectionner les 12 combinaisons qui ont révélé le plus de polymorphisme et le plus grand nombre de bandes. Ainsi les amorces choisies ont été utilisées dans un second temps afin de réaliser l'amplification sélective sur les ADN de l'ensemble des isolats étudiés. Les différentes combinaisons testées et celles sélectionnées pour l'amplification de l'ensemble de la collection sont indiquées sur le tableau XIII

La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume de 10 µl composé de 2 µl d'ADN et de 8 µl de mix réactionnel préparé comme suit :

Tableau XIV : Composition du volume réactionnel utilisé lors des amplifications spécifiques

Composants	Mélange d'amplification	Volume	concentration finale
1	Tampon de PCR (10x)	1µl	1X
2	dNTP (2mM)	1 µl	0,25 mM
3	Amorce MseI	0,5 µl	0,5ng
4	Amorce EcoRI	0,5 µl	0,5ng
5	Taq polymérase (5U/µl)	0,1 µl	1 U
6	H ₂ O	4,9 µl	/
7	ADN	2 µl	/

Tableau XIII : Combinaisons des amorces testées et celles sélectionnées (indiquées en jaune) pour l'analyse du polymorphisme lors de l'amplification spécifique

Combinaisons	Amorces RcoRI		Amorces Mse	
	Codes	Nucléotides	Codes	Nucléotides
1	E32	AAC-3'	M12	AC-3'
2	E32	AAC-3'	M13	AG-3'
3	E32	AAC-3'	M29	
4	E32	AAC-3'	M47	CAA-3'
5	E33	AAG-3'	M12	AC-3'
6	E33	AAG-3'	M13	AG-3'
7	E33	AAG-3'	E29	
8	E33	AAG-3'	M47	CAA-3'
9	E32	AAC-3'	M1	A-3'
10	E32	AAC-3'	M2	C-3'
11	E32	AAC-3'	M3	G-3'
12	E32	AAC-3'	M42	AGT-3'
13	E33	AAG-3'	M1	A-3'
14	E33	AAG-3'	M2	C-3'
15	E33	AAG-3'	M3	G-3'
16	E33	AAG-3'	M42	AGT-3'
17	E35	ACA-3'	M1	A-3'
18	E35	ACA-3'	M2	C-3'
19	E35	ACA-3'	M3	G-3'
20	E35	ACA-3'	M42	AGT-3'
21	E40	AGC-3'	M1	A-3'
22	E40	AGC-3'	M2	C-3'
23	E40	AGC-3'	M3	G-3'
24	E40	AGC-3'	M12	AC-3'
25	E40	AGC-3'	M13	AG-3'
26	E40	AGC-3'	M48	CAC-3'
27	E40	AGC-3'	M50	CAT-3'
28	E41	AGG-3'	M54	CCT-3'
29	E41	AGG-3'	M1	A-3'
30	E41	AGG-3'	M2	C-3'
31	E41	AGG-3'	M3	G-3'
32	E41	AGG-3'	M12	AC-3'
33	E41	AGG-3'	M13	AG-3'
34	E41	AGG-3'	M48	CAC-3'
35	E41	AGG-3'	M50	CAT-3'
36	E41	AGG-3'	M54	CCT-3'
37	E42	AGT-3'	M1	A-3'
38	E42	AGT-3'	M2	C-3'

39	E42	AGT-3'	M3	G-3'
40	E42	AGT-3'	M12	AC-3'
41	E42	AGT-3'	M13	AG-3'
42	E42	AGT-3'	M48	CAC-3'
43	E42	AGT-3'	M50	CAT-3'
44	E42	AGT-3'	M54	CCT-3'
45	E35	ACA-3'	M1	A-3'
46	E35	ACA-3'	M2	C-3'
47	E35	ACA-3'	M3	G-3'
48	E35	ACA-3'	M12	AC-3'
49	E35	ACA-3'	M13	AG-3'
50	E35	ACA-3'	M48	CAC-3'
51	E35	ACA-3'	M50	CAT-3'
52	E35	ACA-3'	M54	CCT-3'
53	E36	ACC-3'	M1	A-3'
54	E36	ACC-3'	M2	C-3'
55	E36	ACC-3'	M3	G-3'
56	E36	ACC-3'	M12	AC-3'
57	E36	ACC-3'	M13	AG-3'
58	E36	ACC-3'	M48	CAC-3'
59	E36	ACC-3'	M50	CAT-3'
60	E36	ACC-3'	M54	CCT-3'
61	E37	ACG-3'	M1	A-3'
62	E37	ACG-3'	M2	C-3'
63	E37	ACG-3'	M3	G-3'
64	E37	ACG-3'	M12	AC-3'
65	E37	ACG-3'	M13	AG-3'
66	E37	ACG-3'	M48	CAC-3'
67	E37	ACG-3'	M50	CAT-3'
68	E37	ACG-3'	M54	CCT-3'
69	E32	AAC-3'	M33	AAG-3'
70	E32	AAC-3'	M55	CGA-3'
71	E32	AAC-3'	M82	TAT-3'
72	E32	AAC-3'	M88	TGC-3'
73	E33	AAG-3'	M33	AAG-3'
74	E33	AAG-3'	M55	CGA-3'
75	E33	AAG-3'	M82	TAT-3'
76	E33	AAG-3'	M88	TGC-3'
77	E35	ACA-3'	M33	AAG-3'
78	E35	ACA-3'	M55	CGA-3'

➤ Cycles d'amplification : L'amplification sélective a été effectuée selon les étapes suivantes ; En premier, une dénaturation des échantillons a été réalisée à 94°C pendant 2 minutes, suivie d'un cycle comportant les phases suivantes : une dénaturation de la double hélice à 94°C durant 30 secondes, une hybridation des amorces à 65°C pendant 30 secondes et une élongation à 72°C pendant 1 minute. Cette dernière étape est suivie de 12 autres cycles identiques au cycle précédent, durant lesquels la température d'hybridation est diminuée à chaque cycle de 0,7°C. Par la suite, 23 cycles, comportant chacune les étapes suivantes ; 94°C durant 30 secondes, 56°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 1 minute ont été effectués. Enfin une élongation finale est induite à 72°C pendant 2 secondes.

➤ Séparation des fragments d'amplifications par électrophorèse capillaire : La qualité de l'amplification et le degré de polymorphisme obtenu par chaque combinaison d'amorces a été vérifiée par électrophorèse capillaire via le système PRISM® 3100 Genetic Analyzer de Applied Biosystems. Ceci a été réalisé aussi bien lors des tests visant la sélection des amorces, que lors de l'analyse des ADN de l'ensemble des isolats étudiés. L'ABI Prism 3100, est un instrument qui utilise un faisceau laser pour exciter les fragments fluorescents qui migrent par électrophorèse selon leur taille. La fluorescence spécifique aux différents fluorochromes utilisés au niveau des amorces est détecté et le signal est envoyé à un micro-ordinateur pour être traité et analysé. Le support de migration est un polymère liquide (pop4-ABI) contenant, le polymère de séparation, les sels nécessaires à la migration et l'urée (conditions dénaturantes).

Pratiquement, à partir de l'ADN issu de la pré-amplification, 2 µl d'ADN a été prélevé de chaque trois produits PCR portant chacun un fluorochrome différent. Les trois ADN sont mélangés à 4 µl d'eau distillée stérile, puis 1µl est prélevé du mélange et déposé sur plaque à 96 puits. 5µl du standard de taille ROX 500 de Applied Biosystem sont alors ajoutés à chaque échantillon ainsi préparé. Les échantillons subissent une dénaturation via une incubation à 94°C pendant 5 minutes dans un thermocycleur. A leur sortie de l'appareil PCR, les tubes sont plongés directement dans de la glace puis la plaque est introduite dans l'appareil.

III. 2. 10. 7 3. Analyse des données : Les données brutes ont été extraites en ayant recours aux logiciels GeneMapper (Applied Biosystems). Ce dernier a permis d'obtenir pour chaque ADN étudié, le nombre de bandes révélées par chaque combinaison ainsi que la taille de chacune de ces bandes. Les données ainsi obtenues ont été visualisées via le programme Excel. L'AFLP étant un marqueur dominant, les données réunies ont

été transformées en matrice binaire dans laquelle la valeur 1 correspond à la présence d'une bande et la valeur 0 à son absence. La construction de la matrice a été possible grâce au programme Excel de MICROSOFT en utilisant la formule =SI(X = " " ; 0 ; 1), X étant la position d'une valeur sur la feuille Excel.

C. Analyse hiérarchique : La classification hiérarchique (Hierarchical Cluster Analysis (HCA)) (Ward, 1963), est une méthode mathématique de classification non-supervisée qui permet de grouper des profils selon leur ressemblance statistique.

Les données réunies dans la matrice binaire ont fait l'objet d'une analyse hiérarchique en utilisant le programme PAST (Paleontological Statistics) version 2.03 (HAMMER, Ø ; HARPER, D.A.T. and RYAN P.D. 2001). Le coefficient de Jaccard (Legendre and Legendre, 1998) choisi au cours de cette analyse pour l'étude de la similarité des profils, a pour formule : $J_{\text{Jaccard}} = n_{ab} / n_a + n_b$ où ; n_{ab} , étant le nombre de fragments communs présents sur les deux profils A et B, n_a , le nombre total de fragments présents sur le profil A, enfin, n_b , est le nombre total de fragments présents sur le profil. Ce coefficient a été choisi car il considère que l'absence d'un fragment dans deux profils n'implique pas de ressemblance entre les individus concernés. La mesure de similarité entre profils ne tient donc compte que des fragments communs. En effet, la double absence d'un fragment peut avoir des causes très différentes, alors que la double présence implique nécessairement une ressemblance entre les deux individus.

Un dendrogramme a été généré à l'aide de la méthode Unweighted Pair Group Method using Arithmetic average (UPGMA) (Legendre et Legendre, 1998 ; Sneath et Sokal, 1973). Cette dernière méthode a été choisie car elle a été utilisée dans la majorité des études génétiques concernant les champignons phytopathogènes. Lors de la construction d'un arbre phylogénique, la méthode UPGMA admet un taux évolutionnaire constant, elle admet également que les mutations se produisent dans une certaine régularité, plus ou moins prévisible (l'horloge moléculaire = molecular clock) (Holsinger and Jansen, 1993)

Nous avons également inclus une analyse Bootstrap comportant 1000 replicats qui permet d'estimer la robustesse des nœuds de l'arbre généré. Par conséquent les grandeurs indiquées aux nœuds de chaque clade représentent les valeurs de Bootstrap.

Par ailleurs une matrice de similarité a été obtenue, celle-ci a permis de calculer le pourcentage de similarité entre chaque paire d'isolat.

D. Polymorphism information content (PIC) : Le PIC a été évalué grâce au programme PowerMarker version 3.25 (Liu et Muse, 2005). Il permet une estimation de la force de discrimination d'un locus car cette estimation tient compte, non seulement du

nombre d'allèles générés mais également de la fréquence relative de ces allèles (Smith *et al.*, 1997). Sa valeur est comprise entre 0 (monomorphisme) et 1 (allèle très hautement discriminant). Elle a été estimée séparément pour chaque marqueur selon la formule suivante, mise au point par Boststein *et al.* (1980) :

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - 2 \left[\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n p_i^2 p_j^2 \right]$$

p_i étant la fréquence de l'allèle i^{th} , et n le nombre d'allèle

I.V. Résultats et Discussion

IV.1. Prévalence de la tache bronzée du blé et confusion entre les symptômes, dans les régions céréalières d'Algérie :

Les prospections ont été réalisées sur les cultures de blé durant trois campagnes agricoles (de 2004 à 2006) dans différentes régions céréalières du pays. Les localités concernées sont : Alger, Blida, Boumerdès, Tizi-Ouzou, Bouira, Bejaia, Ain-Defla, Medea, Tipaza, Constantine, Guelma, Skikda, Setif, Mascara.

Le diagnostic sur les cultures de blé dur et celles de blé tendre, a été basé sur l'observation du symptôme typique du Tan Spot, caractérisé par une nécrose de forme ovale et entourée d'une chlorose régulière. Certains symptômes atypiques pouvant également être dus au *P. tritici repentis*, ont été aussi considérés telles que la lésion nécrotique et la chlorose localisée en lésion ovale. Ainsi 214 échantillons ont été collectés au niveau de 66 localités dans les 15 Wilayas : 83 échantillons de l'Est, 130 échantillons du Centre et un échantillon de l'Ouest.

Les symptômes observés sur les champs infectés, sont dans la plupart des cas une nécrose ovale régulièrement entourée d'une chlorose, il s'agit en effet des symptômes typiques du Tan Spot (Fig. 13). Nous avons également observé sur un échantillon provenant de Bejaia en 2005, des symptômes caractérisés uniquement par une nécrose sans aucun halo jaunâtre. Les taches sont ovales d'environ 0.5 cm, et collées les unes aux autres. Des spores de l'agent causal ont été observées sur les échantillons.

Les résultats obtenus, ont montré la présence de la maladie dans 39 localités prospectées au niveau de 15 wilayas à travers le pays. L'importance de la maladie est jugée plus grande sur les régions littorales comparées aux régions sub-littorales. De même qu'elle semble plus présente dans le centre du pays, comparé à l'Est et à l'Ouest. En effet et à titre indicatif, dans la wilaya de Tizi ousou nous avons noté des champs qui ont présenté des pourcentages d'infection compris entre 80 et 100%, ceci est aussi vrai dans la wilaya de Bejaia et Médéa.

La tache bronzée du blé, est présente aussi bien sur les cultures de blé dur que celles de blé tendre ; les variétés attaquées par le pathogène dans les champs visités ont été les suivantes, Hidab, Anza (Blé tendre) et Vitron, GTA/dur, Waha, Bidi 17, Semeto, Chen's (blé dur). Dans ce contexte il est important de noter que les variétés communément cultivées à savoir, Hidab et Vitron paraissent particulièrement sensibles à ce champignon. En effet durant les trois campagnes agricoles (de 2004 à 2006) durant lesquelles nos prospections se sont déroulées, ces deux variétés ont toujours été infectées par le *P. tritici-repentis*.



A. Champ infecté par du tan spot à Tipaza en 2007

Figure 13 : Etat des champs de blé infecté par la maladie du tan spot dans quelques régions du pays



B. Champ infecté à Oued-Smar (Alger), 2005



C. Champ infecté à Bejaia, 2006

Par ailleurs nous avons noté sur les cultures de blé à travers les zones céréalières du pays, la présence en plus du *Mycosphaerella graminicola* (Anamorphe = *Septoria tritici*) déjà largement rapporté (Fig. 14), d'autres pathogènes susceptibles de prendre de l'importance durant les années à venir. Il s'agit de *Drechslera teres* (Fig. 15) et *Cochliobolus sativus* dont les symptômes induits par ces derniers peuvent prêter à confusion avec ceux induits par le *P. tritici-repentis*.



Figure 14: Limbes de blé infecté par *M. graminicola*



Figure 15: Limbes de blé infecté par *P. teres*

Le diagnostic a été confirmé au laboratoire grâce à des isollements et l'observation des fructifications, caractéristiques rapportées par Zillinsky (1983), Champion (1997), Chand et *al.* (2002).

Dans le cas du *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter (Anamorphe = *Septoria tritici* Rob. ex Desm.), il était possible d'observer sur certains fragments infectés des pycnides de couleur noir. Après incubation en chambre humide, nous avons noté l'excrétion à partir des pycnides d'un cirre blanchâtre contenant des conidies de forme filiformes, de couleur hyalines et septées.

L'espèce *Pyrenophora teres* Drechs., (Anamorphe = *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem.) a été identifiée grâce aux caractéristiques des conidies ; celles-ci sont de couleur maron clair, de forme droite, cylindrique et arrondie aux deux extrémités. Elles mesurent entre 50,64 et 75,96 µm de longueur et entre 11, 51 et 13, 81µm de largeur ; chacune des conidies pouvait avoir entre 4 et 6 cloisons (Fig. 16). Dans la plupart des cas, plusieurs conidies sont produites sur un même conidiophore. Sur milieu PDA, la colonie présente une couleur verte et forme des palmettes ; ce dernier caractère est très spécifique du *P. teres* (Fig.16).

L'espèce *Cochliobolus sativus* (Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur (anamorphe: *Bipolaris sorokiniana* [Sacc.] Shoem.), a présenté des spores de couleur brune-olive, fusiforme, pouvant germer à partir des deux cellules terminales. Leur mensuration a mis

en évidence une longueur comprise entre 50,2 et 82,83 μm et un diamètre variant entre 20,08 et 25,1 μm . Chacune des conidies comporte 3 à 8 cloisons (Fig. 17). Sur milieu PDA les colonies sont vert foncé à noirâtres et très contournées à leur périphérie (Fig. 17).



Figure 16 : Aspects culturels sur PDA et type de conidies de *Drechslera teres* (Anamorphe de *Pyrenophora teres*)



Figure 17 : Aspects culturels sur PDA et type de conidies de *Bipolaris sorokiniana* (Anamorphe du *Cochliobolus sativus*)

IV. 2. Isolement et identification du *P. tritici-repentis* au laboratoire : L'incubation, des fragments de feuilles infectées en chambre humide pendant 48 à 72 h, a permis d'observer au niveau des lésions, la formation de fructifications (Figs. 18 A et A'). Les conidiophores étaient longs, simples, segmentés et de couleur maron foncé (Fig. 18B). Les conidies étaient cylindriques, pouvant germer à partir de toutes les cellules qu'elles soient polaires ou médianes (18Fig. C et D). Elles mesuraient entre 116 et 217 μm de longueur et entre 15 et 18 μm d'épaisseur de même qu'elles possédaient un nombre de cloisons compris entre 5 et 11. La forme de la cellule apicale était très typique caractérisée par une forme conique (forme en tête de serpent) (18Fig. E). Lors de la germination de la conidie, il a été possible d'observer un tube germinatif de croissance latérale. Cette description correspond à l'espèce *Drechslera tritici-repentis* rapportées par Gaur et *al.* (2006), Hunger et Brown (1987), Ellis(1976) et Shoemaker (1962).

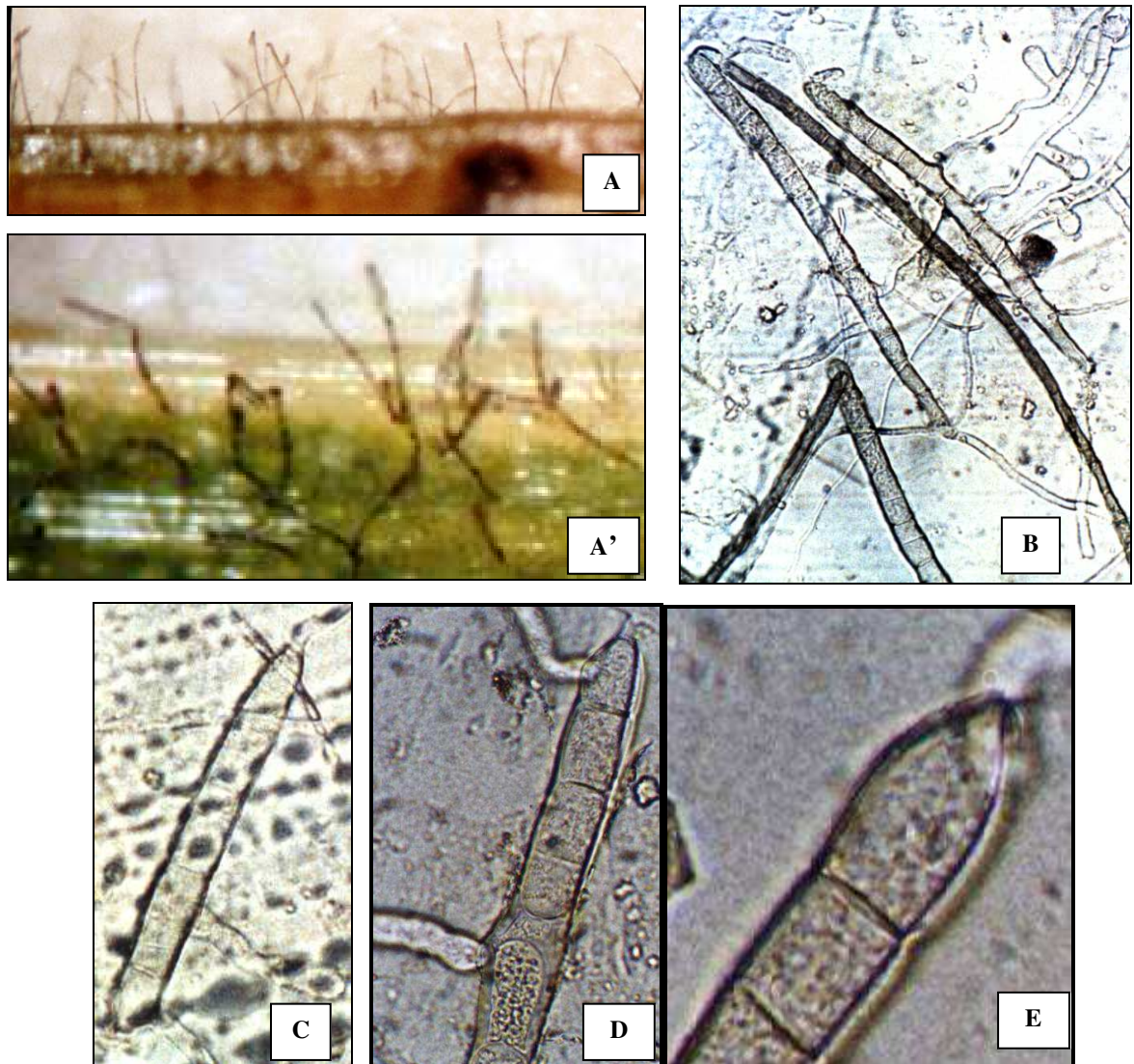


Figure 18 : Identification du *Drechslera tritici-repentis* (Anamorphe du *Pyrenophora tritici-repentis*)

A et A' : Formation des fructifications sur les fragments de limbes foliaires, incubés en chambre humide.

B : Aspects des conidiophores sur les fragments végétaux

C et D : Aspect de la germination des conidies

E : Aspect de la cellule apicale au niveau de la conidie

Les conidies ont été transférées individuellement sur un milieu PDA ou V8-PDA. Sur milieu PDA les colonies obtenues présentent un mycélium épais généralement cotonneux (Fig. 19A), parfois pelucheux (Fig. 219B), de couleur souvent vert-gris et rarement blanchâtre. La production dans le milieu d'un pigment vert a été notée (Fig. 19C). Aucune fructification du champignon sur milieu PDA, n'est possible, cependant une abondante sporulation est obtenue sur milieu V8-PDA (Fig. 19D). Le vieillissement d'une colonie est caractérisé par l'apparition d'agrégaions constituées de mycélium de forme sphérique et de couleur noir (Fig. 19E). Par ailleurs l'apparition de colonies de couleur orange a été parfois observée durant nos travaux (Fig. 19F). Ce phénomène est accompagné par une perte de la capacité de sporulation chez l'isolat. Il résulte d'un repiquage répété d'explantats sur milieu PDA.

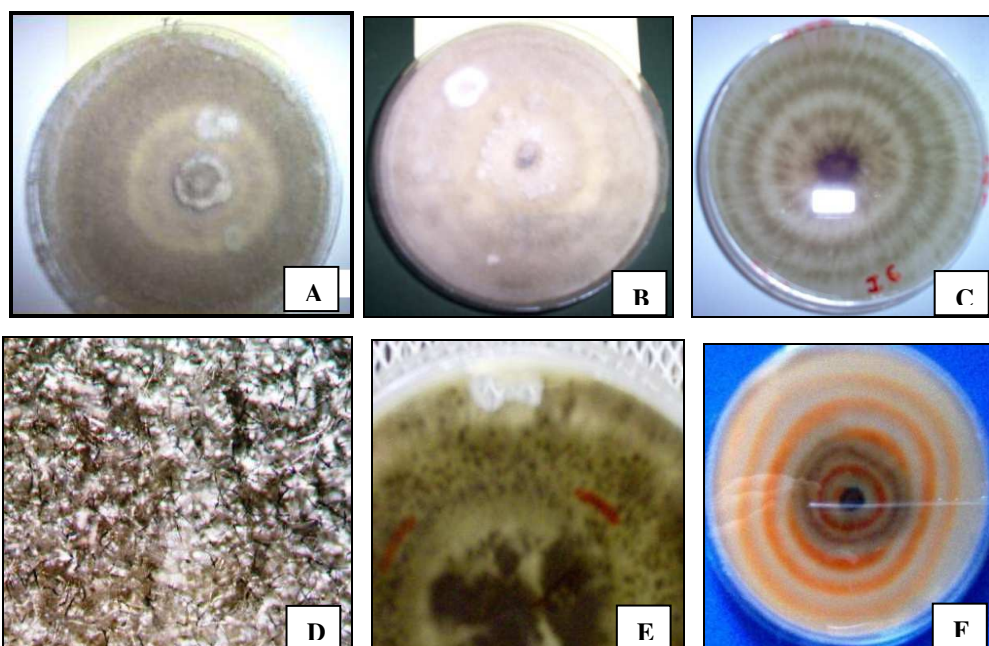


Figure 19 : Présentation des types de colonies du *Drechslera tritici-repentis* (Anamorphe du *Pyrenophora tritici-repentis*) avec différents aspects cultureux (A :mycélium cotonneux, B : mycélium pelucheux, C : pigmentation de couleur verte, D : sporulation sur milieu V8-PDA, E et F : vieillissement de la colonie)

IV.3. Caractérisation morphologique des isolats : Elle est évaluée selon les deux critères : Les dimensions des conidies et la croissance radiale des colonies mycéliennes.

VI.3.1. Mensuration des conidies : Les moyennes de la longueur des conidies chez les 42 isolats étudiés sont reportés dans le tableau XIV ; leur variation est représentée par les figures 20 et 21.

L'analyse des résultats (tab. XIV) montre que la longueur des conidies chez les 42 isolats varie entre $116,35 \mu\text{m} \pm 1,94$ chez l'isolat Ptr42 et $217,67 \mu\text{m} \pm 3,46$ chez l'isolat Ptr10.

Tableau XIV : Longueur moyenne des spores en μm des 42 isolats étudiés

Ptr1	Ptr2	Ptr4	Ptr5	Ptr6	Ptr7	Ptr9	Ptr10
143,78	149,136	196,768	192,192	175,084	160,576	156,936	217,672
Ptr11	Ptr13	Ptr14	Ptr15	Ptr17	Ptr18	Ptr19	Ptr20
184,86	154,44	196,248	175,344	202,748	179,348	217,1	144,3
Ptr21	Ptr22	Ptr24	Ptr25	Ptr29	Ptr30	Ptr31	Ptr33
121,68	155,3	151,5	168,116	190,736	140,296	145,756	128,65
Ptr34	Ptr35	Ptr36	Ptr38	Ptr42	Ptr44	Ptr61	Ptr62
154,8	183,092	177,736	189,072	116,35	116,8	131,05	158,9
Ptr63	Ptr64	Ptr65	Ptr66	Ptr67	Ptr68	Ptr69	Ptr70
131,95	171,9	149,5	159,15	144,55	170,95	164,75	154,8
Ptr71	Ptr72						
117,15	148						

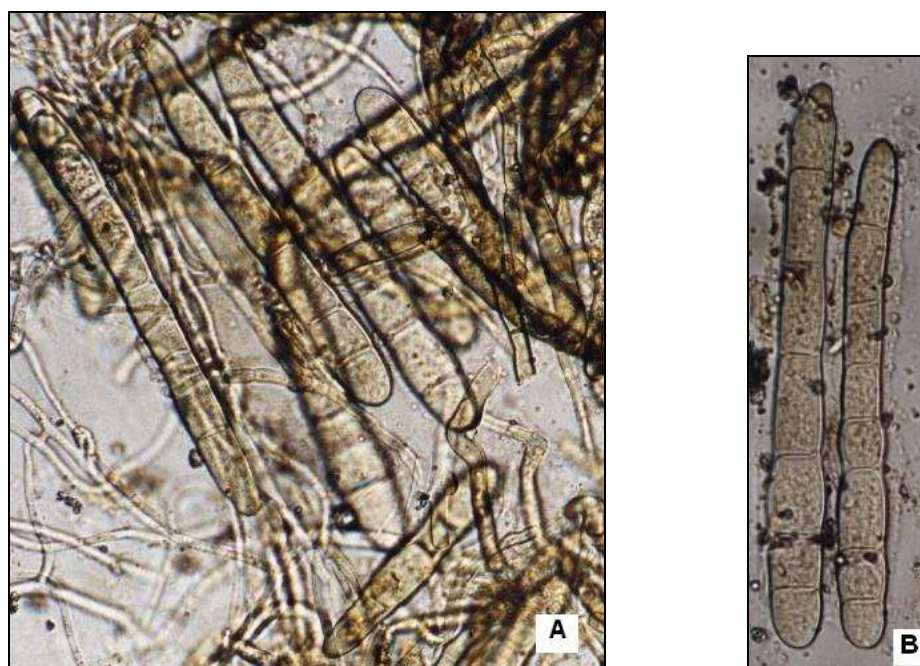


Figure 20 : A. Sporulation sur milieu V8-PDA (3,2x25) ; notez la différence de taille entre conidies de même âge.

B. Conidies de taille différente (3,2x25) ; noter la différence dans la longueur mais pas dans la largeur.

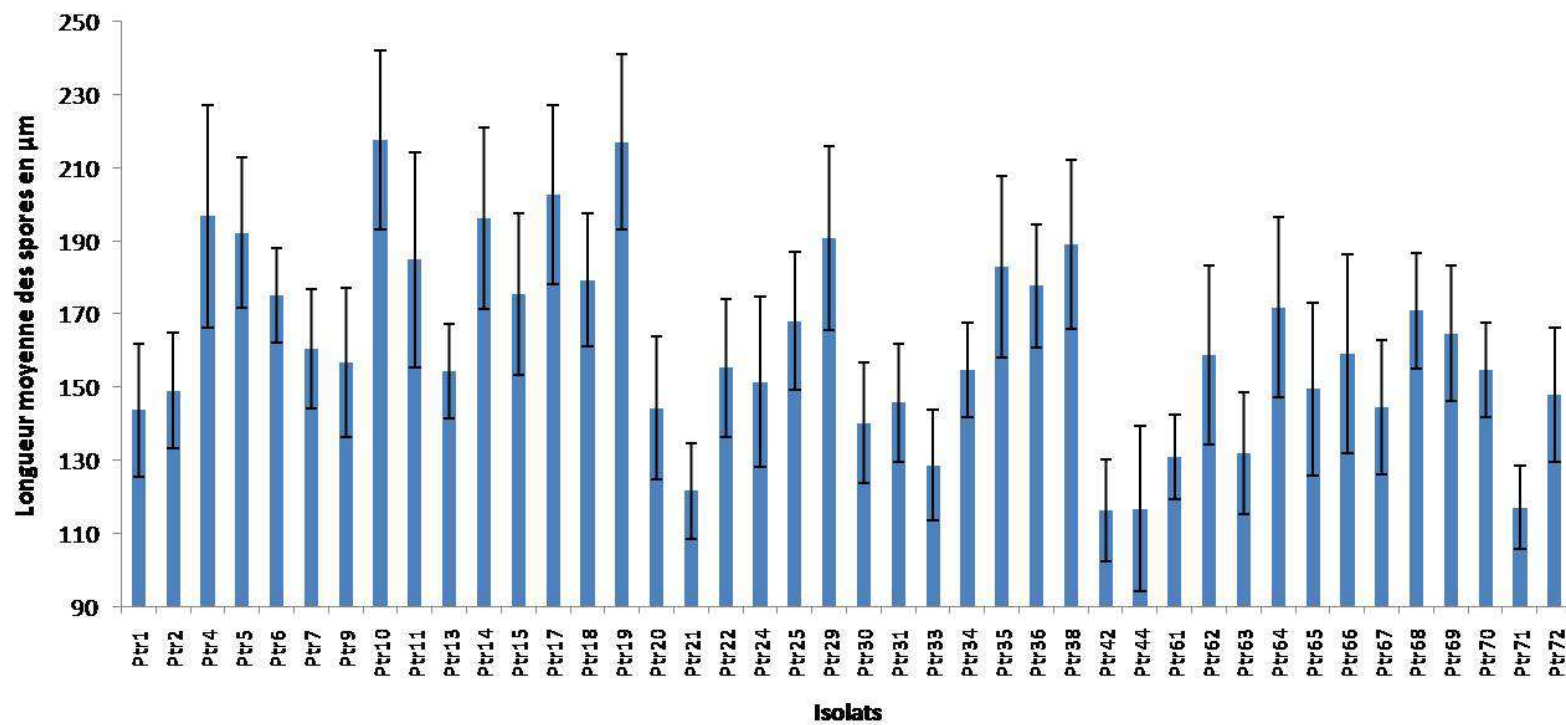


Figure 21 : Longueur moyenne des spores en μm

La comparaison entre les valeurs notées pour chacun des isolats grâce à une analyse de la variance, a révélé l'existence d'une différence très hautement significative entre les souches étudiées ($P=0,000<0,1$) (Tab. XV).

Tableau XV Tableau de l'analyse de la variance de la longueur des conidies

Sources	Sommes des carrés	ddl	Moyennes des carrés	F	Signification
Modèle corrigé	1401719,82	41	34188,289	84,518	0,000
Intercept	54872637,621	1	54872637,621	135651,984	0,000
Isolats	1401719,829	41	34188,289	84,518	0,000
Erreur	832482,396	2058	404,510		
Total	57104936,930	2100			
Total corrigé	2234202,225	2099			

Le diamètre des spores a très peu varié chez les différents isolats étudiés. En effet nous avons noté chez l'ensemble des isolats étudiés, uniquement deux valeurs de la largeur 15,6 μm ou 18,2 μm .

Les moyennes du nombre de cellules par conidie chez les 42 isolats étudiés sont reportées dans le tableau XVI ; leur différence est illustrée par la figure 22.

Tableau XVI : Moyenne du nombre de septa chez les 42 isolats étudiés

Ptr1	Ptr2	Ptr4	Ptr5	Ptr6	Ptr7	Ptr9	Ptr10
6,42	6,28	7,2	7,72	5,84	7,64	6,46	8,74
Ptr11	Ptr13	Ptr14	Ptr15	Ptr17	Ptr18	Ptr19	Ptr20
11,52	5,64	7,38	6,04	8,8	8,28	8,14	7,06
Ptr21	Ptr22	Ptr24	Ptr25	Ptr29	Ptr30	Ptr31	Ptr33
5,42	7,44	7,54	7,44	8,74	7,06	7,44	5,96
Ptr34	Ptr35	Ptr36	Ptr38	Ptr42	Ptr44	Ptr61	Ptr62
7,46	7,7	7,44	7,34	7,08	6,84	6,44	7,54
Ptr63	Ptr64	Ptr65	Ptr66	Ptr67	Ptr68	Ptr69	Ptr70
5,96	8,12	7,04	8,16	6,94	8,26	7,36	8,12
Ptr71	Ptr72						
5,96	6,9						

L'analyse des résultats (Tabl. XVI) ci-dessus, montre que le nombre de cellules par conidie chez les 42 isolats a varié en moyenne entre 5,42 chez l'isolat Ptr21 et 11,52 chez l'isolat Ptr11. La comparaison entre les valeurs notées pour chacun des isolats grâce à une analyse de la variance, a révélé l'existence d'une différence très hautement significative entre les souches étudiées ($P=0,000<0,1$) (Tab. XVII).

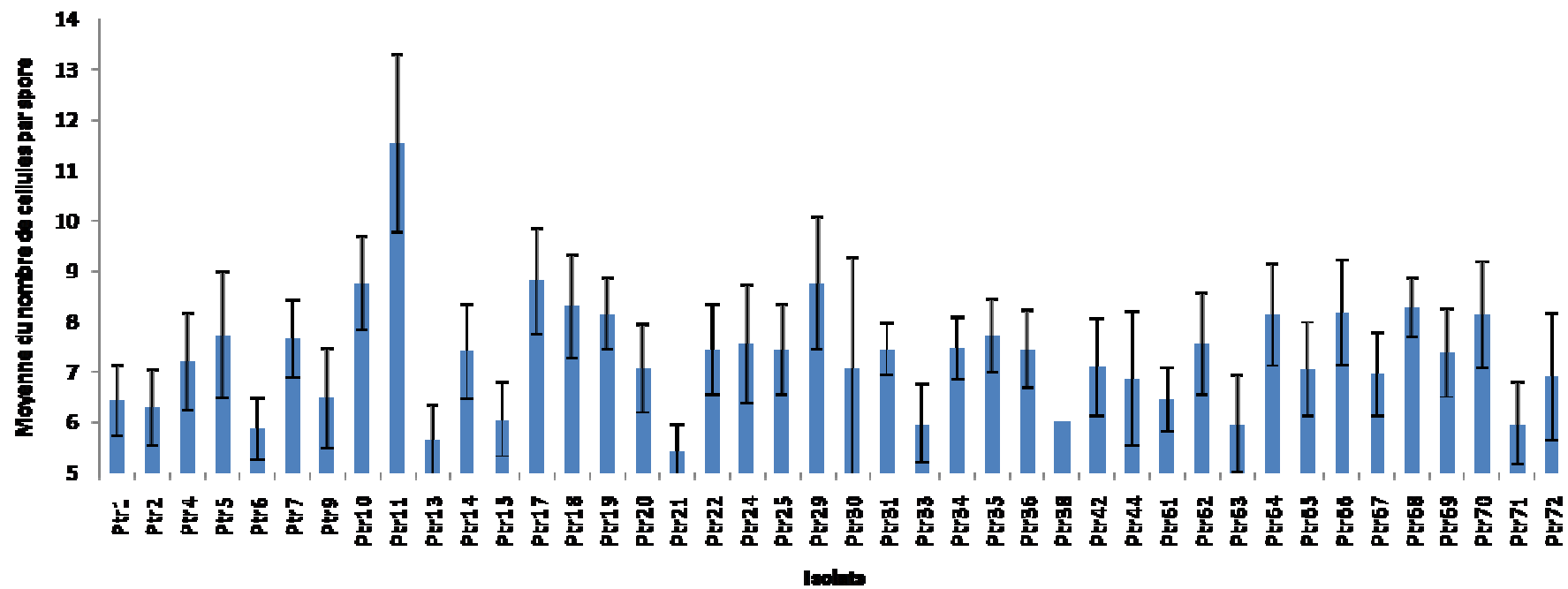


Figure 22 : Moyenne du nombre de cellules par spores chez les 42 isolats étudiés

Tableau XVII : Tableau de l'analyse de la variance du nombre de cellules par conidie

Sources	Sommes des carrés	Ddl	Moyennes des carrés	F	Signification
Modèle corrigé	2529,950	41	61,706	64,330	0,000
Intercept	111108,909	1	111108,909	115833,335	0,000
Isolats	2529,950	41	61,706	64,330	0,000
Erreur	1974,062	2058	0,959		
Total	115626,000	2100			
Total corrigé	4504,011	2099			

Les conidies des 42 isolats utilisés lors de ce test, ont montré que le *P. tritici-repentis* possède une variabilité qui touche deux paramètres parmi les trois utilisés ; à savoir la longueur des conidies et le nombre de cloisons qu'elles comportent. Cette variabilité a été confirmée par une analyse statistique qui a mis en évidence une différence très hautement significative entre isolats étudiés et ce, pour les deux paramètres analysés. Concernant le troisième paramètre qui est le diamètre des conidies, nous n'avons pas noté de différence importante. En effet pour les 2100 conidies mesurées (tous isolats confondus) seules, deux valeurs du diamètre ont été notées. Ceci prouve que la variabilité ne touche pas significativement le diamètre de la conidie.

IV.3. 2. Croissance radiale : Les moyennes de la croissance radiale journalière des 72 isolats aux différentes températures (20, 25 et 30 °C) sont indiquées dans le tableau XVIII. L'effet de ces différentes températures sur la croissance radiale journalière moyenne, est représenté par la Figure 23

L'analyse des résultats relatifs à la croissance radiale des isolats, a montré que le *P. tritici-repentis* pouvait croître *in-vitro* sous les trois températures testées (20, 25, et 30°C). En considérant la moyenne de la croissance journalière chez l'ensemble des résultats, nous notons que celle-ci atteint une valeur de 3,92 mm à 20°C, avec un optimum lorsque les cultures sont incubées à 25°C avec 5,28 mm ; elle diminue légèrement à 30°C avec 4,41 mm (Fig. 23).

Une analyse plus affinée des résultats (Tabl. XVIII), en considérant toutes les moyennes de croissance chez chacun des isolats, nous révèle que l'optimum de croissance du mycélium a varié chez les isolats utilisés. En effet si dans la plupart des cas nous observons une meilleure croissance à 25°C, plusieurs isolats possèdent une

Tableau XVIII : Moyenne journalière de la croissance radiale en millimètres des isolats à différentes températures.

Isolats	Températures			Isolats	Températures		
	20°C	25°C	30°C		20°C	25°C	30°C
Ptr1	4.40	4.65	5.16	Ptr37	2.00	2.74	4.43
Ptr2	3.74	4.87	4.28	Ptr38	3.80	6.50	5.06
Ptr3	3.62	4.66	4.20	Ptr39	4.40	6.65	4.93
Ptr4	4.00	4.75	4.28	Ptr40	4.40	5.42	4.33
Ptr5	2.05	2.33	2.45	Ptr41	3.81	3.00	3.31
Ptr6	2.95	4.66	3.45	Ptr42	5.12	5.66	3.66
Ptr7	3.45	4.75	5.71	Ptr43	4.19	6.10	3.45
Ptr8	4.66	5.24	5	Ptr44	1.91	4.30	2.5
Ptr9	2.46	5.60	4.51	Ptr45	4.00	5.78	5.62
Ptr10	4.75	3.12	4.83	Ptr46	5.56	6.05	4.15
Ptr11	4.60	5.50	5.66	Ptr47	5.00	5.88	3.49
Ptr12	1.70	3.74	3.04	Ptr48	5.55	5.45	3.16
Ptr13	3.93	4.85	4.62	Ptr49	4.16	5.45	2.8
Ptr14	4.49	3.35	4.85	Ptr50	5.03	5.85	4.41
Ptr15	2.91	3.41	3.07	Ptr51	2.75	5.80	2.62
Ptr16	4.31	3.25	3.33	Ptr52	5.41	5.66	4.83
Ptr17	2.21	4.37	3.37	Ptr53	4.95	5.60	3.95
Ptr18	4.37	4.87	5.37	Ptr54	3.86	6.15	4.70
Ptr19	4.81	5.00	3.03	Ptr55	5.02	5.85	4.90
Ptr20	3.45	3.12	2.66	Ptr56	5.00	6.25	4.16
Ptr21	5.30	5.6	5.33	Ptr57	5.00	6.00	4.66
Ptr22	1.83	4.7	5.33	Ptr58	5.00	5.80	4.66
Ptr23	5.10	5.65	5.56	Ptr59	5.00	5.60	4.80
Ptr24	4.8	5.8	4.87	Ptr60	4.02	5.80	3.66
Ptr25	3.75	6.00	3.44	Ptr61	3.07	4.75	4.12
Ptr26	4.8	6.49	1.49	Ptr62	4.63	5.30	5.70
Ptr27	2.33	4.95	1.58	Ptr63	4.24	5.00	3.12
Ptr28	3.37	5.90	3.45	Ptr64	1.77	2.90	4.28
Ptr29	2.4	6.10	5.04	Ptr65	4.49	4.75	4.16
Ptr30	3.70	6.60	5.46	Ptr66	3.41	4.80	3.24
Ptr31	4.60	6.15	4.24	Ptr67	2.44	5.75	5.28
Ptr32	4.75	6.95	4.64	Ptr68	5.00	5.80	2.5
Ptr33	4.7	6.60	4.97	Ptr69	4.7	6.06	3.49
Ptr34	1.5	4.75	4.93	Ptr70	4.57	5.15	2.28
Ptr35	3.20	5.15	4.74	Ptr71	2.31	4.37	2.5
Ptr36	5.00	6.90	4.20	Ptr72	4.44	3.87	4.00

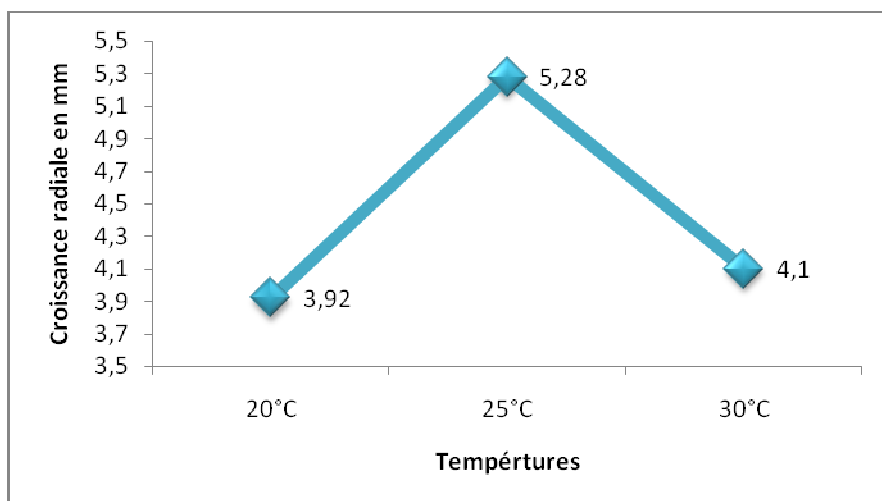


Figure 23 : Croissance radiale moyenne en mm des colonies des 72 isolats analysés

meilleure croissance à 30°C. Seuls trois isolats (Ptr16, Ptr20 et Ptr48) ont montré un maximum de croissance à 20°C.

L'analyse en composantes principales (ACP) des valeurs de la croissance radiale journalière à différentes températures, a permis de séparer les isolats étudiés en groupes distincts. L'interprétation graphique des résultats de l'ACP a été réalisée principalement en fonction du plan 1-2 parce qu'il fournit le maximum d'informations avec 87,57% de contribution à la variation totale (71,20% de contribution pour l'axe 1 et 16,36 pour l'axe 2) (Annexe 5).

L'examen des corrélations existantes entre les variables (= températures) et les axes 1 et 2 indique que l'axe 1 est déterminé positivement par les trois températures (Fig. 24). L'ensemble des variables étudiées (=températures) se retrouve du même côté de l'axe 1, elles contribuent donc dans le même sens à sa formation. Par ailleurs elles occupent une zone restreinte à l'intérieur du cercle des corrélations (l'angle maximum entre deux variables est inférieur à 90°), ceci suggère que toutes les variables sont corrélées positivement entre elles. L'examen des poids factoriels de chacune des températures sur l'axe 1, montre que la température 20°C, est celle qui contribue le plus ($r=0,87$), elle est suivie par 25°C($r=0,83$) puis 30°C ($r=0,82$) (Annexe 6). Toutefois ces valeurs restent très rapprochées ce qui indique que la contribution des trois températures est pratiquement de la même importance.

Par voie de conséquence, nous pouvons conclure que la croissance varie dans le même sens pour les trois traitements ; les trois températures étudiées 20, 25 et 30°C affectent donc la croissance des différents isolats du champignon de la même façon.

La projection des différents isolats sur le plan définie par les axes 1 et 2, répartit les isolats étudiés en six groupes distincts. Certains de ces groupes se distinguent de façon plus évidente que d'autres, tel le groupe composé de l'isolat unique Ptr6, ou encore celui réunissant uniquement Ptr52 et Ptr64 (Fig. 25).

Les différentes analyses réalisées sur les résultats des croissances mycéliennes a montré qu'il existait une certaine différence entre les isolats étudiés. Ce comportement suggère l'existence chez ce pathogène de races "écologiques" ou "écoraces" qui représentent des populations (dans le sens statistique) se distinguant les unes des autres par des préférences environnementales spécifiques (ZADOKS et SCHEIN, 1979).

La différence ou le rapprochement des différents isolats étudiés, quant à l'effet de la température sur leur comportement sur milieu de culture artificiel, et exprimé par le taux de croissance radial des colonies, ne semble avoir aucune relation avec l'origine géographique des isolats. De même qu'elle ne montre aucune relation avec le climat de la région d'où provient l'échantillon à partir duquel l'isolement a été réalisé. Ainsi comme il est possible de le constater dans la figure 25, des isolats provenant de régions géographiques différentes peuvent être retrouvés groupés dans un même ensemble. De même que d'autres isolats provenant de régions géographiquement rapprochées peuvent être classés statistiquement de façon éloignée.

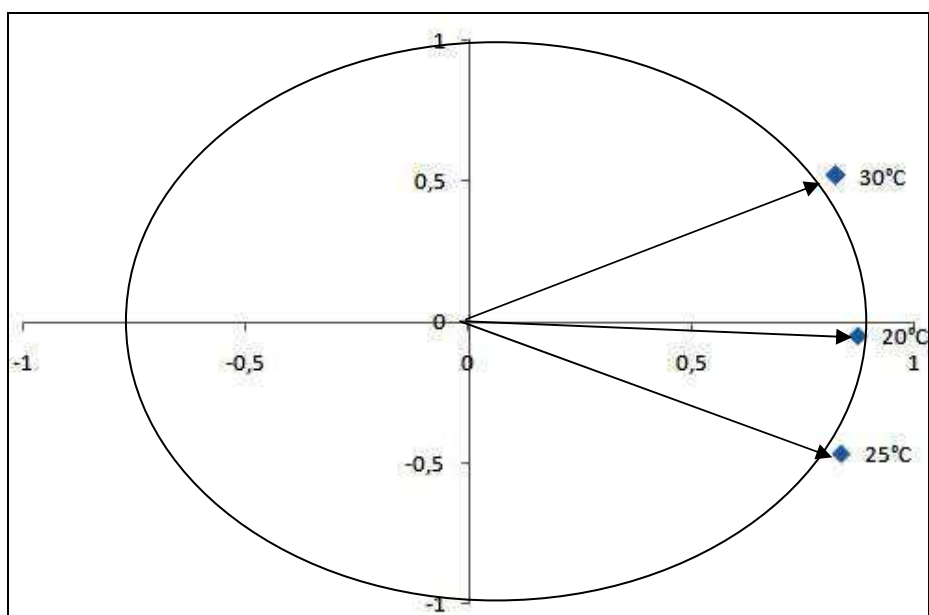


Figure 24 : Cercle des corrélations résultant de l'analyse en composantes principales des croissances radiales obtenues aux trois températures étudiées

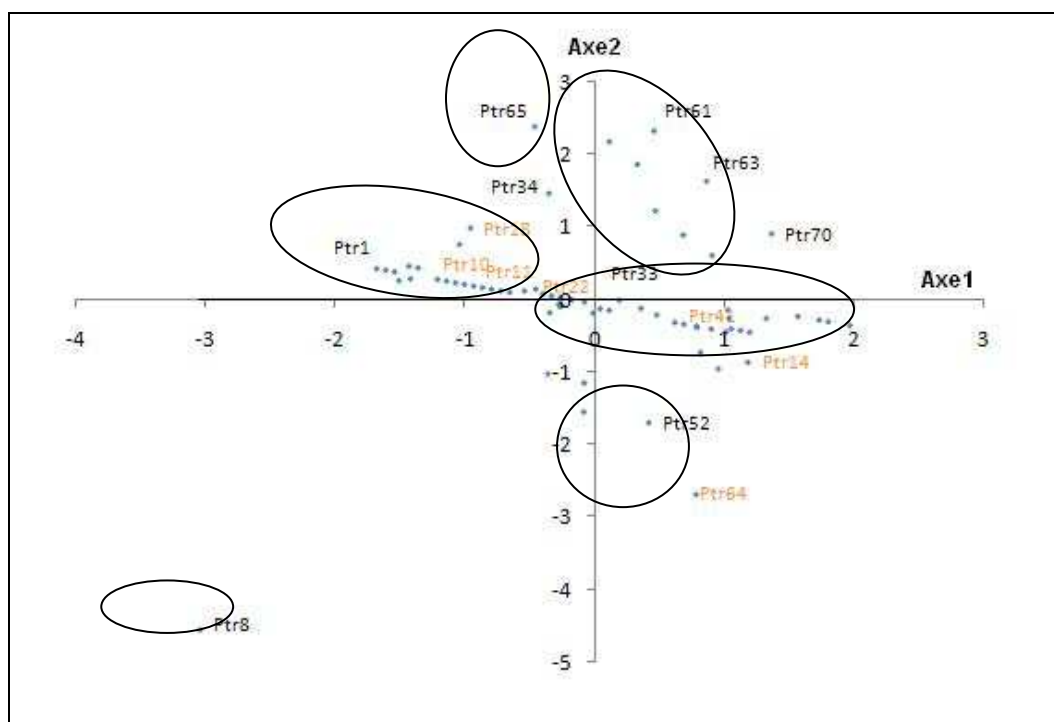


Figure 25: Projection des isolats dans le plan définie par les axes 1 et 2 de l'analyse en composante principale

Les deux critères utilisés pour la caractérisation des isolats, à savoir les dimensions des conidies et la croissance radiale des colonies mycéliennes, ont mis en évidence une variabilité morphologique chez les populations de *P. tritici-repentis* présentes en Algérie.

La variabilité de la morphologie des isolats d'une même espèce a été déjà mentionnée par des travaux antérieurs chez le genre *Drechslera*. Ainsi chez les espèces *D. teres* (Frazzon et al., 2002 ; McDonald, 1967) , *D. tritici-repentis* (Sontos, 1996 in : Frazzon et al. 2002) et *D. graminea* (Benslimane, 2002 ; Christenssen et Graham, 1934) la couleur du mycélium et l'aspect cultural des colonies peuvent varier entre isolats de provenance géographique différente. De même, les conidies de *D. taylorii* présentent une diversité de la longueur, du diamètre et du nombre de cloisons entre isolats étudiés (Zeiders, 1980). Ceci est également vrai pour l'espèce apparentée *Bipolaris sorokiniana*, chez qui, 87 isolats étudiés au Pakistan et appartenant à des régions agro-écologiques différentes, ont présenté une diversité aussi bien au niveau de l'aspect cultural des colonies, que dans les mensurations et la couleur de leur conidie (Assad et al. 2009).

La variabilité morphologique est également fréquente au niveau de plusieurs populations phytopathogènes. Chez *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*, 32 isolats collectés dans l'ouest algérien ont montré une variabilité dans l'aspect cultural des colonies et dans la taille des conidies (Belabdi, 2002). De même, une étude sur 29 isolats de *Sphaeropsis sapinea* collectés au Canada a révélé la présence de plusieurs morphotypes, qui diffèrent par l'aspect des colonies, leur croissance radiale et la tailles des conidies (Hausner et al., 1999).

Si la variation morphologique à l'intérieur d'un taxon est bien connue chez les champignons, son origine reste cependant mal définie (Harrington et Rizzo, 1999). A titre d'exemple il est connu que la morphologie des conidiophores et des conidies chez plusieurs champignons asexués est fortement influencée par le milieu de culture (Booth, 1971).

Les caractères morphologiques, sont au centre de la description et l'identification d'une espèce (Harrington et Rizzo, 1999). Ceci est d'autant plus vrai pour ceux qui sont de nature quantitative, ils peuvent être utilisé pour définir la phylogénie des espèces (Luckow, 1995). Parmi les caractères morphologiques de type quantitatif chez des champignons, la taille des spores est probablement le caractère généralement le plus utilisé (Parmasto and Parmasto, 1992). Toutefois si ces caractères ont été longtemps utilisés pour identifier les champignons pathogènes et pour comparer des isolats de différentes origines, leur analyse présente plusieurs inconvénients majeurs. Ces caractères sont extrêmement variables chez de nombreux champignons, ce qui limite la

portée de leur signification dans la détermination des structures de populations. De plus, d'une manière générale, ces caractères (sauf exceptions très rares) ne peuvent pas faire l'objet d'une analyse génétique précise ; les gènes impliqués dans leur expression étant beaucoup trop nombreux (Lourd, 1995).

IV.4. Détermination des races de *P. tritici-repentis* en Algérie: Les réactions des sept génotypes de blé composant la gamme différentielle à l'égard des 55 isolats de *P. tritici-repentis* sont rapportées au niveau du tableau XIX ; leur appartenance aux différentes races est indiquée également. La distribution des races à travers les zones de cultures, à l'Est, à l'Ouest et au Centre du pays est représentée dans la figure 26.

Après 24 h d'incubation à humidité continue, il a été possible de confirmer la réussite de l'inoculation exprimée par les premières lésions observées sur les feuilles des plantules inoculées. Ces lésions se présentent sous forme de taches de dimensions très réduites, de couleur verte et plus foncée que celles du feuillage, représentant les zones de pénétration du champignon. Les symptômes du tan spot ont pu être observés dès le troisième jour après l'inoculation ; leur notation et la détermination des races ont été effectuées après cinq jours. Les symptômes observés sont au nombre de quatre ; trois types de symptômes représentent la réaction de sensibilité. Il s'agit de taches nécrotiques de forme ovale, de couleur maron, de taches chlorotiques localisées de forme ovale, et enfin des chloroses étendues sur la surface de la feuille. Le quatrième type de symptôme est représenté par des nécroses de taille très réduite de couleur maron foncé ou noir ; il exprime la réaction des génotypes résistants.

Les trois souches de référence Asc1, 86-124, Alg-3-24 utilisées comme témoins ont induit à chaque inoculation les symptômes attendus représentant respectivement les races 1,2, et 5.

Les résultats obtenus avec les différents profils de virulence (Tab. XIX), montrent que les 55 isolats inoculés appartiennent à six races différentes 1, 4, 5, 6, 7 et 8. A l'intérieur de chaque groupe de race, sont réunis des isolats provenant aussi bien de blé dur que de blé tendre, dont la plupart des isolats appartenant à la race 1 ont été isolés de blé dur.

Tableau XIX : Réaction des sept génotypes de la gamme différentielle à l'égard des 55 isolats of *Pyrenophora tritici-repentis* et détermination des races

Isolats																		
	Ptr1	Ptr2	Ptr4	Ptr7	Ptr9	Ptr10	Ptr11	Ptr16	Ptr17	Ptr18	Ptr21	Ptr22	Ptr23	Ptr24	Ptr25	Ptr26	Ptr36	Ptr38
Glenlea	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	R	S-N	R	R	S-N	S-N	S-N
6B-662	R	R	S-C _b	S-C _b	S-C _b	S-C _b	S-C _b	R	S-C _b	R	S-C _b	S-C _b	S-C _b	R	S-C _b	S-C _b	R	SC/b
6B-365	S-C _c	S-C _c	R	S-C _c	R	R	R	S-C _c	R	S-C _c	R	R	R	R	S-C _c	R	S-C _c	R
Salamouni	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4B-160	S-C _c	S-C _c	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-C _c	S-N	S-C _c	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-C _c	S-N
Coulter	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N
4B-1149	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Races	1	1	7	8	7	7	7	1	7	1	7	5	7	?	6	7	1	7

SN= sensibilité avec nécrose, **SC_b=** Sensibilité avec chlorose due à **PtrToxB**, **SC_c=** Sensibilité avec chlorose due à **PtrToxC** , **R=**résistance, **?** = isolat présentant un nouveau profil de virulence.

Isolates																		
	Ptr39	Ptr42	Ptr45	Ptr46	Ptr48	Ptr53	Ptr55	Ptr56	Ptr61	Ptr62	Ptr63	Ptr64	Ptr65	Ptr67	Ptr68	Ptr69	Ptr72	Ptr75
Glenlea	R	S-N	R	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	R	S-N	R	S-N	S-N	R
6B-662	R	R	S-C _b	S-C _b	R	R	R	R	R	S-C _b	R	S-C _b	R	S-C _b	R	R	R	S-C _b
6B-365	R	S-Cc	R	R	S-C _c	S-C _c	S-C _c	S-Cc	S-C _c	R	S-Cc	R	R	R	R	S-C _c	S-C _c	S-Cc
Salamouni	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4B-160	R	S-C	S-N	S-N	S-C	S-C	S-C	S-C	S-C	S-N	S-C	S-N	S-N	S-N	S-N	S-C	S-C	S-N
Coulter	R	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N
4B1149	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Races	4	1	5	7	1	1	1	1	1	7	1	7	?	7	?	1	1	6

SN= sensibilité avec nécrose, **SC_b=** Sensibilité avec chlorose due à **PtrToxB**, **SC_c=** Sensibilité avec chlorose due à **PtrToxC** , **R=**résistance, **?** = isolat présentant un nouveau profil de virulence.

Isolats																
	Ptr76	Ptr77	Ptr78	Ptr79	Ptr80	Ptr81	Ptr82	NA 1-3	NA 8-2	NA 8-3	NA 7-1	NA 3-3	NA 2-1	NA 6-1	NA 3-1	NA 7-4
Glenlea	R	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	SN	SN	SN	R	SN	SN	SN	SN	SN
6B-662	R	R	R	R	S-C _b	S-C _b	S-C _b	R	R	R	Sc/b	R	R	SC/b	R	SC/b
6B-365	R	S-C _c	S-C _c	S-C _c	R	R	R	SC/c	SC/c	SC/c	R	SC/c	SC/c	R	SC/c	R
Salamouni	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4B-160	SN	S-C _c	S-C _c	S-C _c	S-N	S-N	S-N	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN
Coulter	SN	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	S-N	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN
4B-1149	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Races	?	1	1	1	7	7	7	1	1	1	5	1	1	7	1	7

SN= sensibilité avec nécrose, SC_b= Sensibilité avec chlorose due à PtrToxB, SC_c= Sensibilité avec chlorose due à PtrToxC , R=résistance, ? = isolat présentant un nouveau profil de virulence.

Isolats			
	NA 4-2	NA 7-2	NA 7-3
Glenlea	R	SN	SN
6B-662	R	SC/b	SC/b
6B-365	R	R	R
Salamouni	R	R	R
4B-160	SN	SN	SN
Coulter	SN	SN	SN
4B-1149	R	R	R
Races	?	7	7

Une analyse plus fine des résultats, en considérant les pourcentages relatifs à chaque groupe de races (Fig. 27), montre que la majorité des isolats se sont révélés appartenir aux races 1 et 7 ; ces deux dernières semblent prédominantes dans les régions céréalières du pays, avec plus de 80% des isolats. Cette importance prouve la sensibilité particulière des blés cultivés dans nos zones céréalières vis-à-vis des races 1 et 7 ; leurs fréquences sont de valeurs très proches, atteignant 41 et 40% respectivement pour les races 1 et 7. Ceci indique que les deux races en question possèdent les mêmes avantages de sélection dans nos conditions environnementales. La race 1 est présente dans toute les régions de culture, caractérisée par sa capacité à induire une chlorose étendue sur les lignées 6B-365 et 4B-160 et des nécroses sur les cultivars Glenlea et Coulter (Fig. 28). Par contre la race 7 est rarement rencontrée dans l'Est du pays, et semble se localiser surtout à l'Ouest et au Centre. Elle se caractérise par sa capacité à induire une chlorose en forme de taches ovales sur la lignée 6B-662 et des nécroses sur les cultivars Glenlea, Coulter et sur la lignée 4B-160 (Fig. 32).

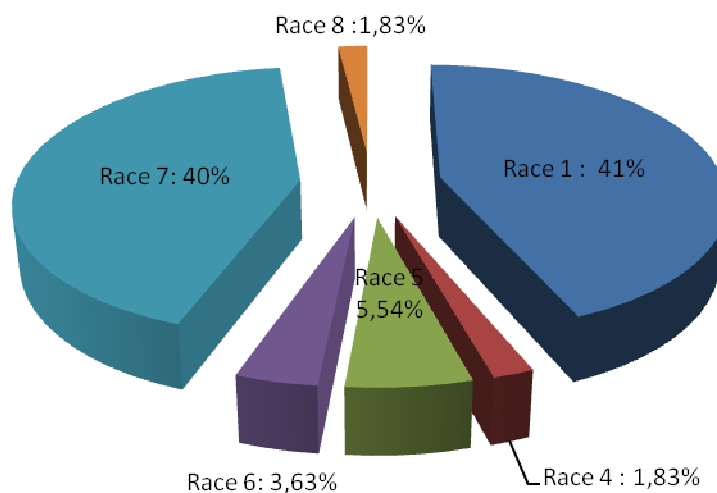


Figure : Pourcentage de chacune des races identifiées en Algérie

Le reste des isolats à savoir 19% des isolats testés sont représentés par les races 4, 5, 6 et 8. La race 4 a été retrouvée avec une fréquence faible, soit uniquement 1,83% des isolats testés. Cette race se différencie des autres races connues, par son incapacité à ne produire aucun symptôme de chlorose ou de nécrose sur les différents génotypes dont la gamme différentielle est composée. En effet toutes les lignées et cultivars inoculés sont résistants à la race 4 ; cette résistance est exprimée par de petites taches très réduites de couleur noir ou maron foncé (Fig. 29). La faible fréquence de cette race est très probablement dûe au fait que les isollements des isolats étudiés ont été réalisés à partir de lésions présentes sur feuilles de blé. Or, la race 4 est une race avirulente, qui produit donc très peu de conidies sur les feuilles de l'hôte, il est donc beaucoup plus probable de l'isoler à partir de chaume de blé là, où le champignon subsiste sous sa

forme saprophytique (Lamari et al., 1998). Ceci étant plus vraisemblable que l'origine de présence de la race 4 sur le blé reste inconnue (Ali et Francl, 2003). Selon ces mêmes auteurs, la race 4 ne serait réellement pas présente dans les champs de blé et que les individus de ses populations identifiés sur les feuilles de blé proviendraient d'autres espèces de graminées spontanées, qui sont des plantes hôtes du *P. tritici-repentis*. En effet ce pathogène est capable d'infecter au moins 26 espèces (Krupinsky, 1992 ; Morral et Howard, 1975). Cette hypothèse trouve un appui considérable dans le fait que cette race est avirulente et donc différente des autres races virulentes sur le blé.

La race 5 a représenté 5,54% des isolats inoculés et se distingue par l'induction de chloroses localisées de forme ovale sur les feuilles de la lignée 6B-662 (Fig. 30). La race 6 a représenté 3,63% des isolats inoculés, identifiée par son habilité à produire des chloroses localisées de forme ovale chez la lignée 6B-662 et une chlorose étendue sur les feuilles de la lignée 6B-365 (Fig. 31). Enfin la race 8 qui semble également faiblement présente dans nos zones de culture avec uniquement 1,83%, se caractérise par sa capacité à induire des nécroses sur les feuilles des variétés Glenlea et des chloroses sur les feuilles des lignées 6B662 et 6B365 (Fig. 33).

Les races 4 et 5 ont été retrouvées uniquement à l'Est du pays, la race 6 n'a été identifiée que dans les échantillons de l'Ouest et du Centre, alors que la race 8 n'est présente que dans les zones de cultures du Centre du pays (Fig. 26).

La prévalence des races 1 et 7 dans nos zones de culture pourrait être due principalement à la sensibilité des génotypes de blé cultivé. Une sensibilité de l'hôte vis-à-vis de ces deux races serait à l'origine d'une pression de sélection réduite exercée à leur égard, ce qui assurerait des chances de propagation plus importantes à ces deux dernières races et qui semble être dans le cas échéant, presque égales. Leur prédominance par rapport à la race 5 pourrait être le résultat de la présence de plusieurs facteurs de virulence qui représente un avantage pour les isolats concernés. En effet, chacune produit deux toxines ; PtrToxA, Ptr ToxC chez la race 1 et PtrToxA, PtrToxB chez la race 7, alors que seule une la PtrToxB est produite par la race 5.

Deux autres facteurs auraient pu favoriser le déploiement de certaines races par rapport à d'autres, directement lié à la biologie du champignon lui même et à son épidémiologie. Le premier à considérer est la nature homothallique du *P. tritici-repentis* qui réduit les chances de recombinaison, et aurait favorisé le maintien pendant une



Figure 28 : Profils de virulence de la race 1, représenté ci-dessus par les symptômes induits par l'isolat Ptr69).

- | | |
|---|-----------------------------------|
| A. Nécrose sur la variété Glenlea | E. Nécrose sur la variété Coulter |
| B. Chlorose étendue sur la lignée 6B365 | F. Nécrose sur la lignée 4B160 |
| C. Résistance sur la lignée 6B662 | G. Résistance sur la lignée 1149 |
| D. Résistance sur la variété Salamouni | |

Les isolats présentant ce profil sont : Ptr1, Ptr2, Ptr16, Ptr18, Ptr36, Ptr42, Ptr48, Ptr53, Ptr55, Ptr56, Pre61, Ptr63, Ptr69, Ptr72, Ptr77, Ptr78, Ptr79, NA-3-1, NA3-3, NA8-3, NA8-2



Figure 29 : Profils de virulence de la race 4, représenté ci-dessus par les symptômes induits par l'isolat **Ptr39**

- | | |
|--|------------------------------------|
| A. Résistance sur la variété Glenlea | F. Résistance la variée Coulter |
| B. Résistance sur la lignées 6B365 | G. Résistance sur la lignée 4B160 |
| C. Résistance sur la lignée 6B662 | H. Résistance sur la lignée 4B1149 |
| D. Résistance sur la variété Salamouni | |



Figure 30 : Profils de virulence de la race 5, représenté ci-dessus par les symptômes induits par l'isolat NA-6-2

- | | |
|---|------------------------------------|
| A. Résistance de la variété Glenlea | E. Nécrose sur la variété Coulter |
| B. Résistance de sur la lignée 6B365 | F. Nécrose sur la lignée 4B160 |
| C. Chlorose localisée sur la lignée 6B662 | G. Résistance sur la lignée 4B1149 |
| D. Résistance sur la variété Salamouni | |

Les isolats présentant se profil sont : Ptr22, NA-6-2, NA 7-1



Figure 31: Profils de virulence de la race 6 représenté ci-dessus par les symptômes induits par l'isolat Ptr25

- | | |
|--|------------------------------------|
| A. Résistance de la variété Glenlea | E. Résistance sur la lignée 4B1149 |
| B. Chlorose étendue de sur la lignée 6B365 | F. Nécrose sur la variété Coulter. |
| C. Chlorose localisée sur la lignée 6B662 | G. Nécrose sur la lignée 4B160 |
| D. Résistance sur la variété Salamouni . | |

Les isolats présentant se profil sont : Ptr25, et Ptr75



Figure 32: Profils de virulence de la race 7 représenté ci-dessus par les symptômes induits par l'isolat Ptr4.

- | | |
|---|------------------------------------|
| A. Nécrose sur la variété Glenlea | E. Nécrose sur la variée Coulter |
| B. Résistance de sur la lignée 6B365 | F. Nécrose sur la lignée 4B160 |
| C. Chlorose localisée sur la lignée 6B662 | G. Résistance sur la lignée 4B1149 |
| D. Résistance sur la variété Salamouni | |

Les isolats présentant se profil sont : Ptr4, Ptr9, Ptr10, Ptr11, Ptr19, Ptr21, Ptr23, Ptr26, Ptr38, Ptr46, Ptr62, Ptr64, PtrPtr67, Ptr80, Ptr81, Ptr82, NA 7-2, NA 7-4.



Figure 33 : Profils de virulence de la race 8 représenté ci-dessus par les symptômes induits par l'isolat Ptr70

A. Nécrose sur la variété Glenlea

E. Nécrose sur la variété Coulter

B. Chlorose étendue sur la lignée 6B365

F. Nécrose sur la lignée 4B160

C. Chlorose localisée sur la lignée 6B662

G. Résistance sur la lignée 4B1149

D. Résistance sur la variété Salamouni

longue période de certaines races uniquement avant l'apparition d'autres. Le second est l'aptitude de ce champignon à effectuer plusieurs cycles durant la même saison, alors que chacune de ces races se reproduit de la même façon et avec un rythme équivalent. Cette particularité a donné un avantage certain aux conidies des races 1 et 7 qui vont être par voie de conséquence, plus abondantes dans la nature.

L'analyse des réactions de la gamme différentielle aux races existantes dans les échantillons testés révèle que la race 1 induit le même type de symptômes aussi bien chez les blés durs que les blés tendres. En effet le cultivar Glenlea qui est un blé tendre et le cultivar Coulter qui est un blé dur, réagissent à l'infection par la race 1 en produisant sur les feuilles de blé des nécroses. Nous constatons aussi que les lignées 6B-365 (Blé tendre) et 4B-160 (Blé dur), réagissent à l'inoculation par cette même race en induisant des chloroses étendues sur les feuilles de blé infectées. Cependant nous avons noté que l'infection par la race 5 induisait des symptômes différents chez les deux espèces de blé. L'observation de la réaction de la gamme différentielle aux isolats appartenant à cette race, révèle qu'elle produit des chloroses chez le blé tendre alors qu'elle induit l'apparition de nécroses chez les blés durs ; cette observation est la même que celle rapportée par Gamba et al. (1998). Ce comportement est également valable pour la race 6 qui est à l'origine de symptômes différents chez les deux espèces de blé, puisque nous retrouvons des chloroses chez les lignées 6B662 et 6B365 (Blé tendre) et des nécroses chez la lignée 4B160 et le cultivar Coulter (Blé dur).

Nous avons également remarqué que les races 5 et 6 provoquaient sur les feuilles de la variété Coulter et de la lignée 4B160 l'apparition de nécroses. Ce type de symptômes met en évidence la présence éventuelle chez ces deux races de toxines non encore identifiées qui seraient différentes de PtrToxA.

Par ailleurs, nous avons noté que la majorité des isolats identifiés comme la race 1 ont été isolés à partir de feuilles de blé tendre, alors que la majorité des isolats identifiés comme appartenant à la race 7 ont été isolés à partir de feuilles de blé dur infectées. Aung (2001) a suggéré dans ses travaux que la réaction de l'hôte peut induire une pression de sélection sur la composition génétique du *P. tritici-repentis*. En effet la pression de sélection est déterminée par la structure de la population hôte et l'environnement ; elle est plus intense lorsque des génotypes uniformes sont cultivés sur de grandes surfaces et sous des conditions favorables au développement de la maladie (Parlevliet, 1983). Il semblerait donc à travers nos résultats que dans le cas des races 1 et 7 qu'une certaine « adaptation » possible serait en voie de développement, respectivement au blé tendre et au blé dur. Ceci paraît plus vrai semblable, dans la mesure où certaines conditions sont bien réunies dans ce sens. Ainsi si le nombre de variétés homologuées sont au nombre de 32 pour le blé dur et 26 pour le blé tendre

(Boufenar-Zaghouane et Zaghoune, 2006), 65% des superficies emblavées par le blé dur ne sont occupées actuellement que par Vitron et Waha, alors que 80% de la superficie emblavée par le blé tendre est occupée par Hiddab (Boufenar-Zaghouane et Zaghoune, (2006). Dans ce même contexte l'analyse des résultats montre que les isolats appartenants à la race 5 ont toujours été isolés des feuilles infectées de blé dur, confirmant les résultats de Lamari et al. (1998), qui rapportent que tous les isolats collectés dans l'Est algérien et appartenant à la race 5, ont été isolés à partir de blé dur. Cette constatation laisse suggérer l'hypothèse selon laquelle il existerait chez le *P. tritic-repentis* une association entre les isolats produisant uniquement les chloroses et les blés dur (Lamari et Bernier, 1989c).

Nous notons également au niveau de nos résultats, l'appartenance de certains isolats à des races différentes, alors qu'ils ont été isolés à partir de la même lésion. C'est le cas des isolats Ptr75 et Ptr76, prélevés d'une même lésion sur une variété de blé dur dans la région de Boumédès. Les deux isolats, appartenaient à deux races différentes ; le premier s'est révélé comme race 6, alors que le second a montré un nouveau profil de virulence non identifié auparavant et qui ne correspond à aucune des huit races actuellement connues. Dans d'autres cas au contraire, les isolats provenant d'une même lésion ont été identifiés comme appartenant à la même race. Ainsi nous avons noté que les isolats Ptr77, Ptr78 et Ptr79 provenant d'une même lésion prélevée sur la variété Hiddab à la station expérimentale de Oued-Smar (Alger) ont été tous les trois classées comme race 1. De même que les isolats Ptr80, Ptr81 et Ptr82 isolés d'une même lésion provenant d'un blé tendre dans la région de Bouira, se sont révélés appartenir à la race 7.

Par ailleurs, les isolats Ptr65, Ptr68, Ptr24, Ptr76 and NA 4-2 ont produit un nouveau profil de virulence, en se comportant comme avirulents sur les quatre génotypes de blé tendre inoculés, Glenlea, 6B-662, 6B- 365, Salamouni, alors qu'ils ont infecté les deux génotypes de blé dur ; 4B160 et Coulter. Ces deux derniers génotypes ont réagi à l'infection par des nécroses localisées de forme ovale (Fig.34). En raison du fait que ce profil de virulence a été rapporté pour la première fois, nous proposons que ces quatre isolats (Ptr65, Ptr68, Ptr24, Ptr76 et NA 4-2) soient classés en tant que nouvelle race.

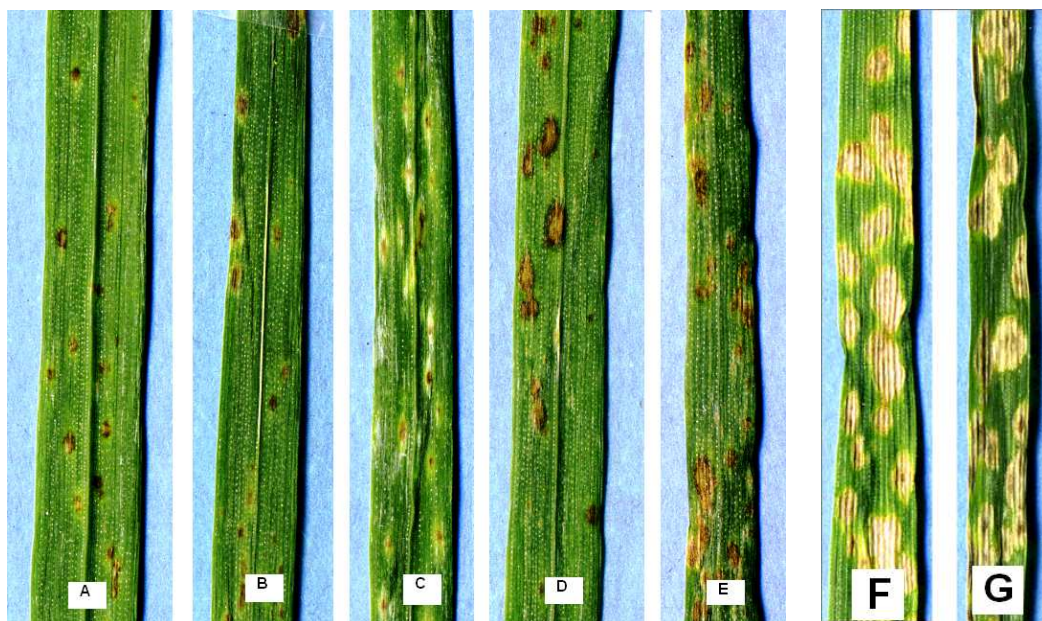


Figure 34 : Nouveau profil de virulence induit par la nouvelle race. Noter la résistance des blés tendres (A, C, D, E) et la sensibilité des blés durs exprimée par des nécroses (F et G).

- | | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|
| A. Résistance de la variété Glenlea | E. Résistance de la lignée 4B1149 |
| B. Résistance de la lignée 6B365 | F. Nécrose sur la lignée 4B160 |
| C. Résistance de la lignée 6B662. | G. Nécrose sur la variété Coulter |
| D. Résistance de la variété Salamouni | |

Les isolats présentant ce profil sont : Ptr24, Ptr65, Ptr68, Ptr76 et NA 4-2

Les prospections que nous avons réalisées dans les régions céréalières à travers le pays afin d'étudier la maladie du tan spot, ainsi que les isollements de l'agent causal *P. tritici-repentis* et sa caractérisation pathologique, ont révélé l'existence en Algérie de six races distinctes de ce pathogène. Il s'agit en l'occurrence des races 1, 4, 5, 6, 7 et 8 dont quatre parmi ces dernières (1, 4, 7 et 8) sont décrites en Algérie pour la première fois. En effet la race 1 qui est d'ordinaire prédominante en Australie (Ali *et al.* 2006), et en Amérique du Nord, est également présente au Moyen Orient et au Caucase (Lamari *et al.*, 1995 ; 1998), n'a jamais été rapportée auparavant en Algérie. Sa présence dans notre pays est signalée pour la première fois ; de plus elle semble prédominante dans nos zones de culture. Ceci est également vrai pour la race 4 qui n'a été rapportée jusqu'à présent qu'au Canada et aux Etats Unis (Lamari et Strelkov, 2010) ; cependant cette dernière est plutôt rare dans nos zones de cultures, cette particularité a été déjà rapportée dans d'autres régions du monde. Ainsi au Canada une étude sur l'évolution des races dans les champs de blé au Manitoba et Saskatchewan entre 1990 et 1994, a révélé une présence de la race 4 avec une fréquence inférieure à 1% (Lamari *et al.*, 1998). La mise en évidence des races 7 et 8 est également une première en Algérie, puisqu'elles n'ont été retrouvées jusqu'aujourd'hui qu'au Moyen Orient et au Caucase (Lamari *et al.*, 2002 ; Lamari et Strelkov, 2010).

En revanche, les résultats présentés ici, confirment la présence des races 5 et 6 déjà connues dans les zones céréalières de l'Est du pays et rapportées dans des travaux antérieurs (Lamari et Strelkov, 2010). En effet l'existence des profils de virulence correspondant à ces deux races, a été mis en évidence pour la première fois à partir d'échantillons de blé collectés dans l'Est du pays (Lamari *et al.*, 1995 Strelkov *et al.*, 2002). La race 5 a été retrouvée ultérieurement aux Etats Unis (Ali *et al.*, 1999), au Canada (Strelkov *et al.*, 2002), en Syrie et en Azerbaïdjan (Lamari *et al.*, 2005) ; la race 6 n'a été identifiée jusqu'à maintenant qu'en Algérie.

Par ailleurs, ces inoculations, ont mis en évidence la présence d'une nouvelle race qui induit chez Coulter et 4B160 des nécroses localisées semblables à celles produites par la race 1 sur la variété Glenlea. Dans le cas de la race 1, l'apparition des nécroses est une conséquence de la production chez le pathogène de la toxine PtrToxA (Lamari *et al.*, 2003). Cependant dans le cas des isolats Ptr65, Ptr68, Ptr24, Ptr76 et NA 4-2, l'apparition des symptômes ne peut être due à la même toxine, puisque la variété Glenlea qui possède le gène *Tsn1* responsable de la sensibilité à la PtrToxA, reste résistante à ces isolats. En effet le gène *Tsn1* localisé au niveau du bras long du chromosome 5B conditionne la sensibilité à la Ptr ToxA (Faris *et al.*, 1996). L'absence du gène ToxA, sous sa forme allélique connue et qui permet la production de la toxine PtrToxA semble donc évidente.

De même la résistance des lignées 6B365 et 6B662 montre respectivement l'absence des produits des gènes ToxC et ToxB. En effet, la lignée 6B365 comporte dans son génome le gène *Tsc1* responsable de la sensibilité de ce génotype à Ptr ToxC, alors que la lignée 6B662 possède le gène *Tsc2* responsable de la sensibilité de cette dernière lignée à la toxine Ptr ToxB (Gamba *et al.*, 1998 ; Friesen et Faris, 2004). Ces cinq isolats obtenus à partir de feuilles de blé dur, appartiendraient à une nouvelle race capable d'attaquer uniquement les blés durs et pas les blés tendres. Le processus d'infection serait sous le contrôle d'une nouvelle toxine responsable de l'induction des nécroses chez les deux génotypes sensibles Coulter et 4B-160, et par conséquent ces derniers possèderaient le récepteur spécifique de cette toxine. Cette dernière hypothèse trouve une confirmation dans le fait que le pathosystème blé- *P. tritici-repentis* est conforme au modèle des toxines où la compatibilité est le résultat d'une interaction entre une toxine produite par le pathogène et son éventuel récepteur existant chez l'hôte (Lamari et Strelkov, 2003).

La présence de cette nouvelle race, implique des conséquences importantes sur certaines bases du pathosystème Blé/*P. tritici-repentis*. Il est reconnu que parmi les huit races de ce pathogène les races 2, 3 et 5 sont considérées comme les races de base en raison du fait qu'elles sont capables de produire une seule toxine. Alors que les autres races 1, 6, 7 et 8 sont considérées comme des races combinées à partir des races de base en raison du nombre et du type de toxines produites (Strelkov et Lamari; 2003). A titre d'exemple la race 1 connue pour produire les toxines PtrToxA et PtrToxC est considérée comme une combinaison de la race 2 qui produit PtrToxA et de la race 3 qui produit la PtrToxC (Strelkov et Lamari; 2003). La découverte d'une nouvelle race pouvant induire la synthèse d'une seule toxine complètement différente de celles connues à ce jour, impliquerait l'existence d'une nouvelle race de base. Par conséquent, le modèle proposé par Strelkov et Lamari (2003) établissant la relation entre les différentes races est admissible uniquement lorsque l'interaction hôte / pathogène est considéré pour le blé tendre. L'introduction du blé dur dans la gamme d'hôte différentielle du blé dur rend l'hypothèse en question caduque.

La capacité du champignon à se reproduire par un mode sexué, offre à cette espèce la possibilité de recombinaison entre races possédant des gènes de virulence différents et par conséquent implique la possibilité d'apparition de nouvelles races recombinantes. Il n'est pas à exclure, les différentes espèces herbacées spontanées hôtes de *P. tritici-repentis* qui sont une source importante d'inoculum primaire, et qui jouent également un rôle important dans l'apparition de nouveaux profils de virulence chez ce champignon.

Nos travaux ont montré qu'il existait une importante variabilité pathologique chez les populations de *P. tritici-repentis* en Algérie. Elle pourrait être d'origine diverse ; la variabilité d'une population de pathogène est déterminée par plusieurs facteurs tels le taux de mutation et l'importance des migrations (McDonald et al., 1989). Cette étude a montré également que les blés durs pourraient être à l'origine d'une diversité supplémentaire puisque les isolats présentant un nouveau profil de virulence ne semblent attaquer que les blés durs. Par ailleurs, la présence de ce complexe de races en Algérie est due à la diversité de l'hôte dans nos régions céréalières, où plusieurs variétés ont été cultivées à travers le temps et souvent de provenances diverses. De plus, il est probable que la culture de variétés locales dans certaines régions durant de longues périodes, a exercé une pression de sélection qui aurait contribué à maintenir chez le pathogène et avec des fréquences importantes, différents facteurs de virulence tels PtrToxA, PtrToxB et PtrToxC.

Lamari et al. (2003) ont émis l'hypothèse selon laquelle il était plus probable de trouver des compositions en races plus complexes dans les régions correspondant aux centres d'origine du blé ou encore près de ces régions. Il est à rappeler dans ce contexte que ces régions sont par définition celles où est rencontrée la diversité des espèces la plus importante (Harlan, 1987 ; Vavilov, 1951). Or l'Algérie fait partie du pourtour méditerranéen qui représente justement un centre d'évolution des blés dur et où ces derniers ont été cultivés pendant plus de deux mille ans. Par voie de conséquence, les possibilités d'apparition de nouveaux profils de virulence sont toujours envisageables et devraient être donc encore importantes dans le futur. Toutefois ceci ne serait aisément possible sans une révision de la composition de la gamme différentielle, qui devrait dès lors, comporter des variétés locales ayant connues une évolution simultanée avec les populations pathogènes locales.

L'importante variabilité pathologique révélée chez le *P. tritici-repentis*, agent causal du tan spot représente un facteur supplémentaire pour justifier l'urgence de la prise en charge de ce problème phytosanitaire dans nos cultures de blé. Ceci est d'autant plus vrai, que les espèces pathogènes arrivent à contourner une résistance lorsque leurs populations respectives possèdent une variabilité qui leur permet de répondre à la pression de sélection (Nelson, 1992). Les pathogènes possédant les plus grands potentiels d'évolution, offrent les plus grands risques de contourner les gènes de résistance majeurs ; de même qu'ils évoluent de manière à contourner les autres méthodes de contrôle tel que l'utilisation de fongicides (McDonald, 2004).

Pour développer des formes de résistance stables et des stratégies de lutte durables qui permettent de minimiser la pression de sélection dans les populations pathogènes de *P. tritici-repetis*, il est important non seulement de connaître leur diversité mais également leur capacité d'évolution à travers des surveillances annuelles de la distribution des races.

IV.5. Inoculation de confirmation du nouveau profil de virulence : Les résultats obtenus montrent que les isolats Asc1, 90-2 et Alg3-24 ont induit sur les génotypes de la gamme différentielle les symptômes typiques des races 1, 4 et 5 respectivement. L'ensemble des isolats inoculés à savoir Ptr65, Ptr68, Ptr24, Ptr76 et NA 4-2 ont provoqué une réaction de résistance chez les cinq génotypes de blé tendre (Glenlea, 6B365, 6B662, Salmounela, et Katepwa) et le génotype de blé dur 4B1119. Cette résistance est exprimée par des lésions très réduites de couleur noir ou marron foncé, parfois entourées d'un léger halo jaunâtre qui ne peut pas être confondu avec la chlorose observée lors de la sensibilité de 6B662.

La résistance de la variété Katepwa est une preuve supplémentaire de l'absence des produits des gènes ToxA et ToxB. En effet des analyses génétiques ont montré que ce génotype comporte dans son génome deux *loci* indépendants l'un de l'autre, responsables de la sensibilité aux toxines PtrToxA et PtrToxB (Gamba *et al.*, 1998). Ces deux toxines lorsqu'elles sont produites, provoquent sur les feuilles de la variété Katepwa des chloroses et / ou des nécroses selon la toxine (Lamari *et al.*, 2003 ; Strelov et Lamari, 2003). La présence des produits de l'un des deux gènes de virulence aurait provoqué l'apparition de l'un des deux symptômes.

Les isolats étudiés ont par contre provoqué comme lors des inoculations précédentes des nécroses chez les deux génotypes de blé dur Coulter et 4B160. Aucune évolution significative des symptômes n'a été observée après 14 jours d'inoculation (Fig. 35). Ces résultats ont permis de confirmer les résultats observés précédemment et d'exclure toute possibilité de confusion avec les races 1, 4 ou 5. Par conséquent le profil de virulence noté est nouveau et différent et les isolats appartiennent donc à une nouvelle race.



Réaction de la gamme différentielle après
8 jours d'inoculation

- A) Résistance de Glenlea
- C) Résistance de 6B662
- E) Résistance de Katepwa
- G) Sensibilité de 4B160



Réaction de la gamme différentielle après
14 jours d'inoculation

- B) Résistance de 6B365
- D) Résistance de 4B1149
- F) Sensibilité de Coulter
- H) Résistance de Salamouni

Figure 35 : Réaction des 8 génotypes de blé à l'égard des isolats présentent le nouveau profil de virulence (Race proposée comme race 9)

IV. 6. Caractérisation du téléomorphe *P. tritici-repentis* : Afin d'établir une corrélation entre l'anamorphe *Drechslera tritici-repentis* et le téléomorphe *P. tritici-repentis*, chez les isolats ayant montré un nouveau profil de virulence, la forme parfaite a été produite au laboratoire pour deux isolats Ptr65 et Ptr68. Les résultats obtenus en comparaison à ceux rapportés par des travaux antérieurs considérés comme de référence, sont présentés dans le tableau XX.

La formation des pseudothèces sub-épidermiques a pu être observée sur les fragments de paille à l'œil nu et sous la loupe. Ils présentent une coloration noire et une forme sphérique et sont entourés de papilles (Fig. 36A). Le diamètre des pseudothèces a varié entre 238 et 365 µm pour Ptr65 et entre 210 et 344 µm pour Ptr68, avec des moyennes de 340 et 310 µm respectivement pour Ptr65 et Ptr68. Ces valeurs se situent dans l'intervalle rapporté par d'autres auteurs (Shoemaker, 1966 ; Wiese, 1987).

Tableau XX : Synthèse des résultats obtenus lors de la caractérisation du Téléomorphe *P. tritici-repentis* chez les isolats Ptr65 et Ptr68.

Caractère	Nos résultats (µm)				Wiese (1983) Max-Min (µm)	Zillinsky (1983) Max-Min(µm)	Diekmann et Putter (1995) Max-Min(µm)
	Ptr65		Ptr68				
	Max-Min	Moy	Max-Min	Moy			
Pseudothèces	238 – 365	340	210 - 344	310	200–350	Non indiqué	Non indiqué
<u>Asques</u>							
Longueur	195 – 220	212	200 - 219	202	Non indiqué	Non indiqué	Non indiqué
<u>Ascospore</u>							
Longueur	48 - 58,5	53,79	42 – 54,6	49,16	40–70	40–60	45–70
Diamètre	18 – 24	21,12	18 - 22,5	19,68	18–25	18–25	18–28

L'observation des organes de reproduction a révélé que les asques étaient bitunikés et étroits à la base. Leur longueur a varié entre 195 et 220 µm (moyenne 212µm) pour Ptr65 et entre 200 et 219 µm (Moyenne 202 µm) pour Ptr68 ; chaque asque contient huit ascospores (Figs. 36B, C, D). Ces derniers possèdent trois cloisons transversales et une à deux cloisons longitudinales au niveau des cellules médianes (Fig. 36E).

La longueur de chaque ascospores a varié entre 48 et 58,5 µm (moyenne 53,79) pour Ptr65 et entre 42 et 54,6 µm pour Ptr68 (moyenne de 49,168µm), alors que le diamètre a varié entre 18 et 24 µm avec une moyenne de 21,12µm pour Ptr65 , et entre 18 et 22,5 µm avec une moyenne de 19,68 µm pour Ptr68. Les valeurs mises en évidence par cette caractérisation correspondent à des rapports antérieurs relatifs à la

description de *P. tritici-repentis* (Shoemaker, 1962; Zillinski, 1983; Wiese, 1987; Diekmann et Putter, 1995).

Les résultats ci-dessus ont permis d'établir clairement la corrélation existante entre l'anamorphe *Drechlera tritici-repentis* et le téléomorphe *P. tritici-repentis*. Et par conséquent, ils ont confirmé l'appartenance des isolats présentant un nouveau profil de virulence (Ptr65, Ptr68, Ptr24, Ptr76, NA-4-2) à l'agent causal du tan spot.

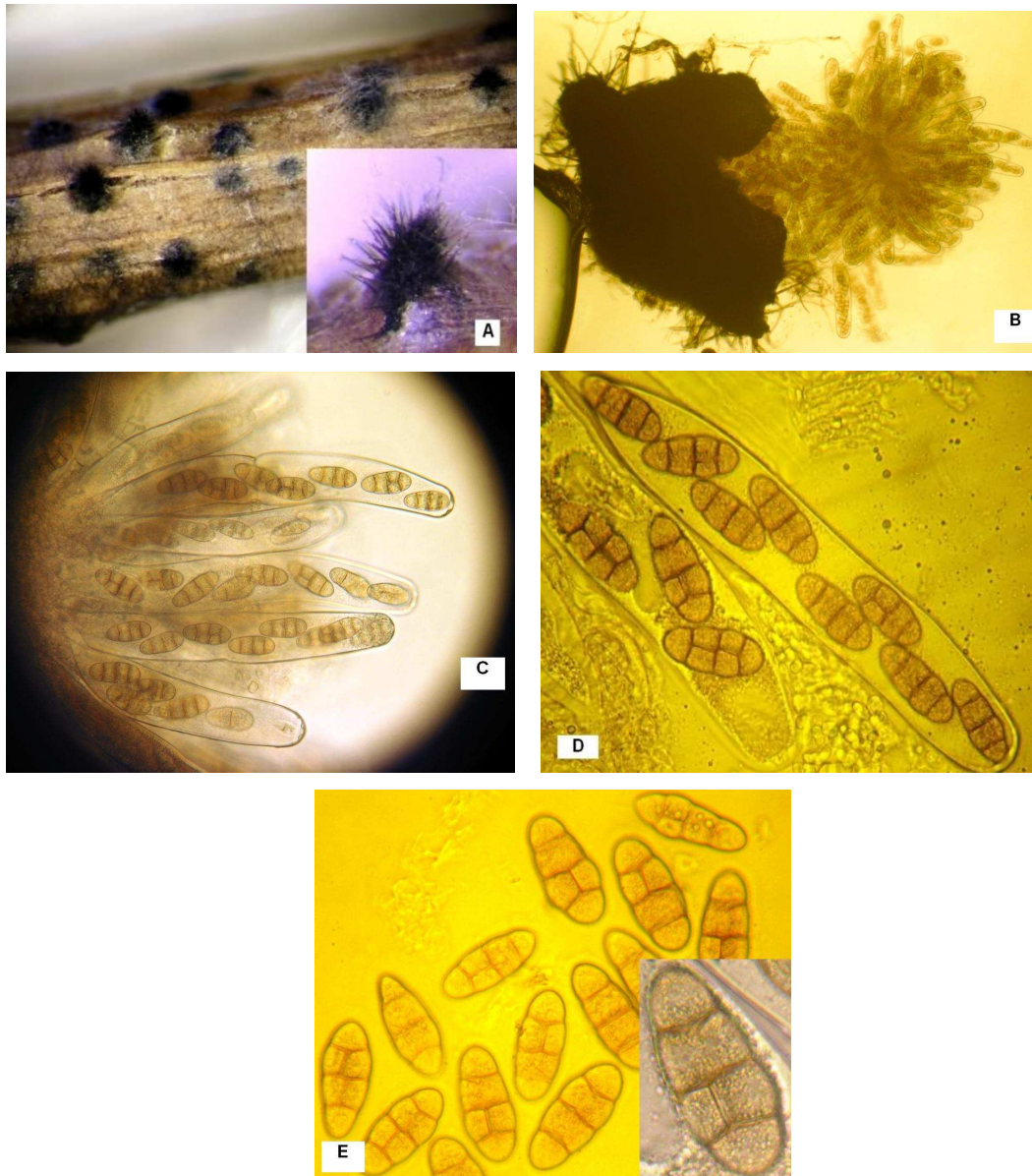


Figure 36 : Obtention du Téléomorphe des isolats ayant produit un nouveau profil de virulence.

(A) Fragments de paille présentant des Pseudothèces. (B) Libération d'asques à partir d'un pseudothèce. (C) Ensemble d'asques. (D) Un asque contenant huit ascospores. (E) Ensemble d'ascospores.

IV.7. Amplification des gènes ToxA et ToxB : Afin de confirmer la présence ou l'absence des gènes ToxA et ToxB respectivement responsables de la synthèse de PtrToxA et PtrToxB, l'ADN génomique des différents isolats inoculés a été extrait, les concentrations obtenus des ADN et leur qualités respectives ont été analysées. La quantité d'ADN obtenue à chaque extraction est jugée appréciable pour les différents échantillons. Il en est de même pour leur qualité respective, puisque nous avons noté dans la plupart des extraits un rapport Do_{260}/Do_{280} correct compris entre 1.8 et 2. Toutefois quelques valeurs se sont révélées en dehors de cet interval ; dans ce cas, certaines étapes de l'extraction ont été reprises à nouveau sur les échantillons concernés.

Les résultats d'amplification des deux gènes étudiés sont résumés dans le tableau XXI ; leur visualisation sur des gels d'agarose sont présentés par les figures 37 et 38.

Tableau XXI : Présentation des résultats obtenus après amplification des gènes ToxA et ToxB

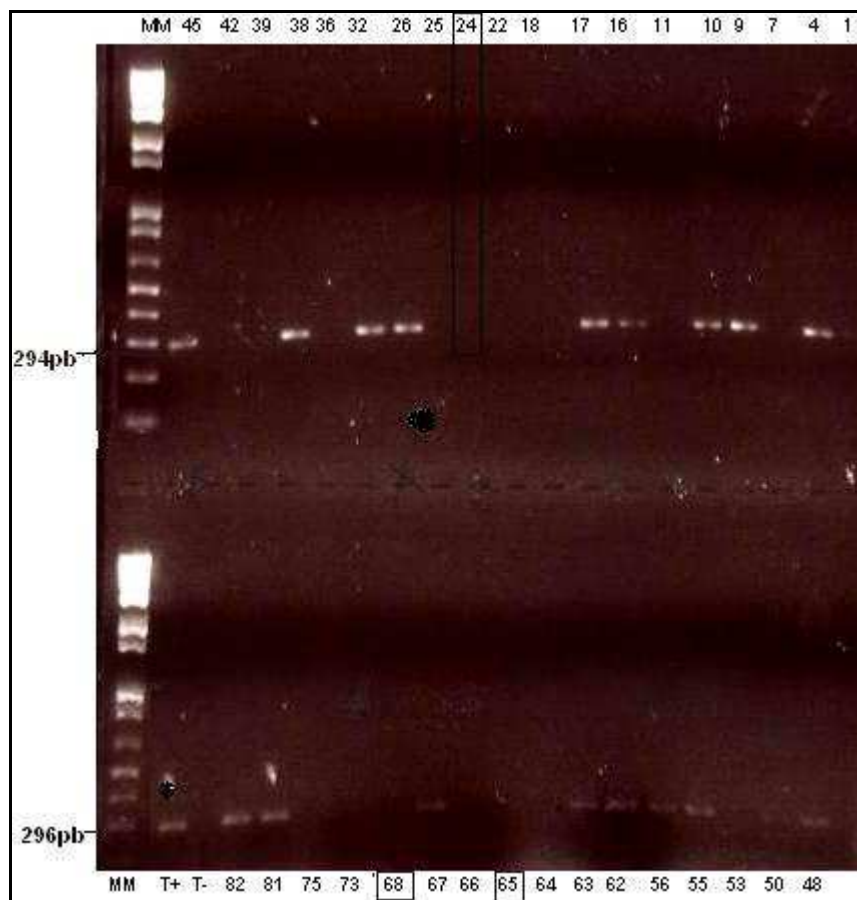
Isolats	Ptr1	Ptr2	Ptr4	Ptr7	Ptr9	Ptr10	Ptr11	Ptr16	Ptr17	Ptr18	Ptr21	Ptr22
Race	1	1	7	8	7	7	7	1	7	1	7	5
TOXA 294pb	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
TOXB 310pb	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
Isolats	Ptr23	Ptr24	Ptr25	Ptr26	Ptr36	Ptr38	Ptr39	Ptr42	Ptr45	Ptr46	Ptr48	Ptr53
Race	7	?	6	7	1	7	4	1	5	7	1	1
TOXA 294pb	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
TOXB 310pb	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
Isolats	Ptr55	Ptr56	Ptr61	Ptr62	Ptr63	Ptr64	Ptr65	Ptr67	Ptr68	Ptr69	Ptr72	Ptr75
Race	1	1	1	7	1	7	?	7	?	1	1	6
TOXA 294pb	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
TOXB 310pb	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Isolats	Ptr76	Ptr77	Ptr78	Ptr79	Ptr80	Ptr81	Ptr82	NA3-1	NA8-2	NA8-3	NA7-1	NA3-3
Race	?	1	1	1	7	7	7	1	1	1	5	1
TOXA 294pb	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
TOXB 310pb	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
Isolats	NA2-1	NA6-1	NA1-3	NA7-4	NA4-2	NA7-2	NA7-3					
Race	1	7	1	7	?	7	7					
TOXA 294pb	+	-	+	-	-	-	-					
TOXB 310pb	-	+	-	+	-	+	-					

+= Amplification du gène, - = Absence d'amplification. ? = Nouvelle race,

 Non concordance des résultats de l'inoculation artificielle et ceux de l'amplification des gènes de virulence

IV.7.1. Amplification du gène ToxA : Le gène ToxA a été mis en évidence chez trois groupes d'isolats : le premier réunit, les isolats Ptr1, Ptr2, Ptr16, Ptr18, Ptr36, Ptr42, Ptr48, Ptr53, Ptr55, Ptr56, Ptr61, Ptr63, Ptr69, Ptr72, Ptr77, Ptr78, Ptr79, NA3-1, NA8-2, NA8-3, NA2-1, NA3-1 et NA3-3 ; ils correspondent à ceux identifiés comme appartenant à la race 1. Le second est composé de 16 isolats Ptr4, Ptr9, Ptr10, Ptr11, Ptr17, Ptr21, Ptr23, Ptr26, Ptr38, Ptr46, Ptr62, Ptr67, Ptr79, Ptr80, Ptr81 et Ptr82, tous appartenant à la race 7. Enfin le troisième groupe est représenté par l'isolat Ptr7, appartenant à la race 8.

Le gène ToxA étudié n'a pas été amplifié chez quatre autres groupes d'isolats : Le premier comporte les trois isolats : Ptr22, Ptr45, NA7-1 ; ce sont ceux reconnus comme race 5. Le deuxième groupe comporte les isolats Ptr25, Ptr75 qui appartiennent à la race 6. Le troisième groupe, réunit les isolats ayant présenté des profils de virulence inhabituels et nouveaux que nous proposons comme race 9. Il s'agit des souches Ptr65, Ptr68, Ptr24, Ptr76 et NA4-2. Enfin le quatrième groupe est représenté par les isolats Ptr64, NA6-1, NA7-2, NA7-3 et NA7-4 appartenant à la race 7 (Fig. 37).



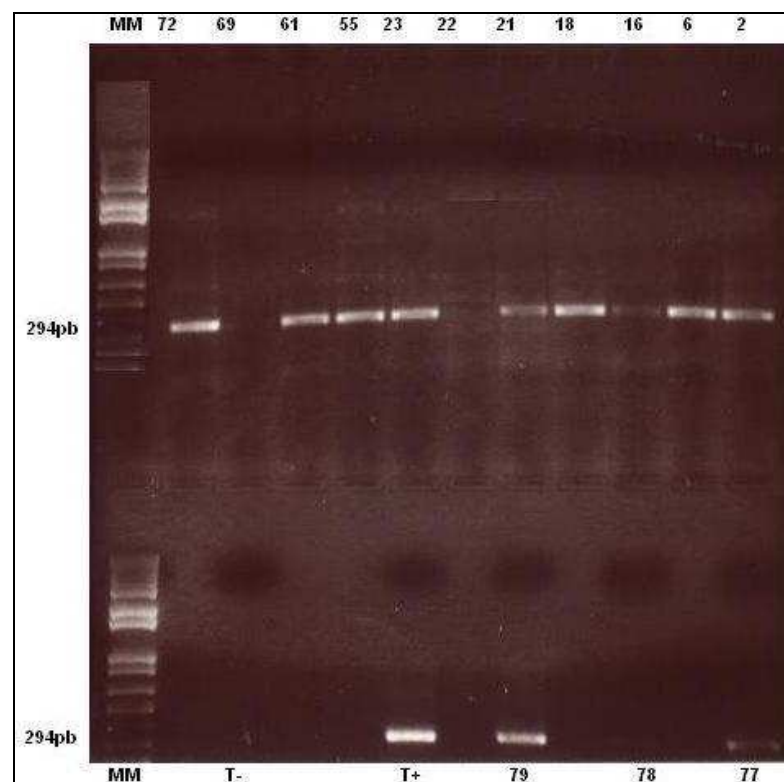
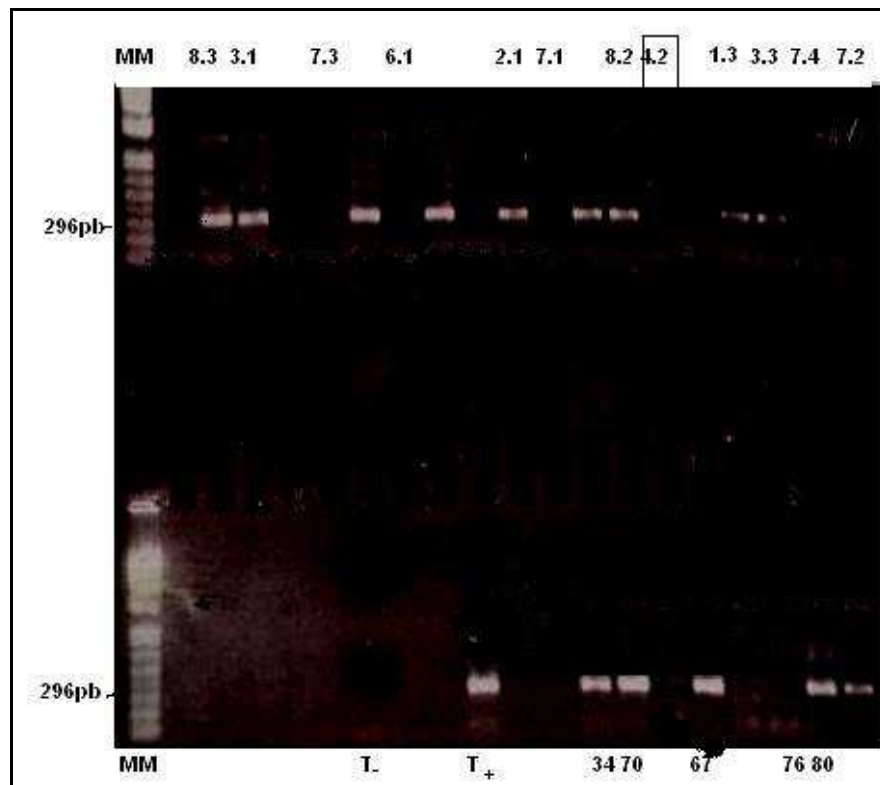


Figure 37 : Visualisation des produits d'amplification du gène ToxA sur gel d'agarose de 1,4%.
(Noter l'absence claire d'amlicons chez les isolats Ptr65, Ptr68, Ptr24, Ptr76, NA4.2)

IV.7.2. Amplification du gène ToxB : Le gène ToxB a été amplifié chez quatre groupes d'isolats. Le premier a réuni les isolats de la race 5 ; Ptr22, Ptr45 et NA7-1. Le second groupe comporte le seul isolat Ptr25 qui appartient à la race 6. Le troisième groupe comporte Ptr4, Ptr10, Ptr11, Ptr17, Ptr21, Ptr23, Ptr26, Ptr38, Ptr46, Ptr62, Ptr67, Ptr79, Ptr80, Ptr81, Ptr82 qui ont été identifiés appartenant à la race 7. Et enfin le quatrième groupe où l'on retrouve Ptr7, le seul isolat appartenant à la race 8.

Aucune amplification n'a été observée chez les 23 isolats dont les profils de virulence correspondent à celui de la race 1 : Ptr1, Ptr 2, Ptr16, Ptr 18, Ptr36, Ptr42, Ptr48, Ptr53, Ptr55, Ptr56, Ptr61, Ptr63, Ptr69, Ptr72, Ptr77, Ptr78, Ptr79, NA3-1, NA8-2, NA8-3, NA3-3, NA2-1 et NA3-1. Le troisième groupe d'isolats chez qui ToxB n'a pas été amplifié comprend les cinq isolats : Ptr65, Ptr68, Ptr24, Ptr76 et NA4-2. Enfin nous n'avons observé aucune amplification chez Ptr9 et NA7-3 qui ont été caractérisés comme la race 7 (Fig. 38) .

L'analyse des résultats de l'amplification des gènes ToxA et ToxB, révèle que le gène ToxA a été amplifié uniquement chez les isolats appartenant aux races 1, 7 et 8 ; induisant l'apparition de nécrose sur les génotypes sensibles de la gamme différentielle. L'apparition de ces symptômes sont en effet le résultat de la production par ces races de la toxine PtrToxA (Lamari et Bernier, 1989b), dont la synthèse chez le pathogène est sous le contrôle de ToxA (Ballance et al., 1996). Par ailleurs ToxB n'a été amplifié que chez les isolats appartenant aux races 5, 6, 7 et 8. Ces dernières ont l'aptitude de provoquer des chloroses chez les génotypes de la gamme d'hôte différentielle grâce à la production de la toxine PtrToxB (Orlaz et al., 1995, Strelkov et Lamari, 2003), sous le contrôle du gène ToxB (Martinez et al., 2001. Strelkov, 2002). Ce gène existe dans les populations de *P. tritici-repentis* en multiples copies, il est présent chez les races en question sous des formes alléliques de séquences différentes (Martinez et al., 2001 ; Strelkov et al., 2006)

Chez les isolats qui ont montré un profil de virulence nouveau et apparentés à une 9^{ème} race, aucune amplification des deux gènes n'a été possible. Cette absence d'amplification suppose que ces cinq isolats appartiendraient à une nouvelle race. En effet nos expériences ont montré d'une part l'absence de production des deux toxines PtrToxA et PtrToxB *in-vivo* (Fig. 34) et d'autre part une possibilité d'absence des gènes responsables de la synthèse de ces toxines ToxA et ToxB (Figs. 37 et 38) chez un nombre limité d'isolats.

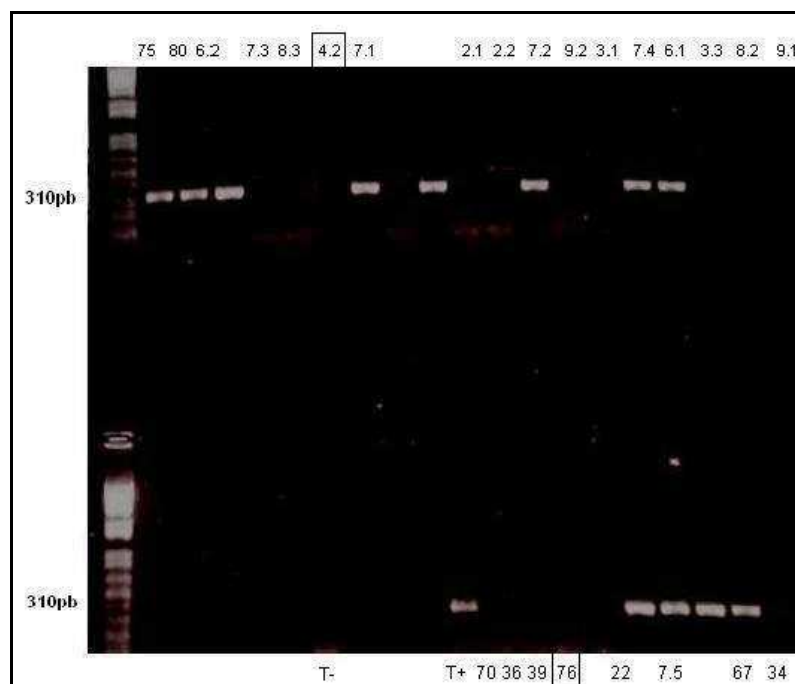
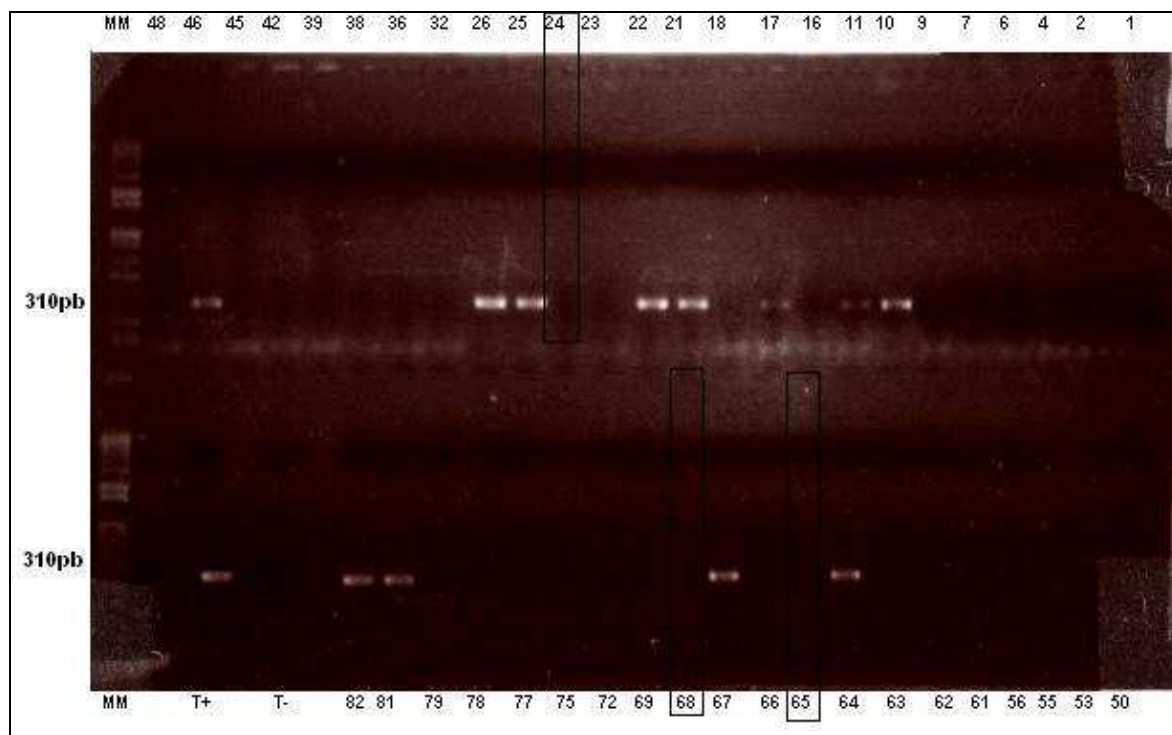


Figure 38 : Visualisation des produits d'amplification du gène ToxB sur gel d'agarose de 1,4%
(Noter l'absence claire d'amlicons chez les isolats Ptr65, Ptr68, Ptr24, Ptr76, NA4.2)

Par conséquent, il nous est possible de conclure que pour 48 isolats sur les 55 étudiés (Ptr1, Ptr2, Ptr4, Ptr7, Ptr10, Ptr11, Ptr16, Ptr17, Ptr18, Ptr21, Ptr22, Ptr23, Ptr24, Ptr25, Ptr26, Ptr36, Ptr38, Ptr39, Ptr42, Ptr45, Ptr46, Ptr48, Ptr53, Ptr55, Ptr56, Ptr61, Ptr62, Ptr63, Ptr65, Ptr67, Ptr68, Ptr69, Ptr72, Ptr76, Ptr77, Ptr78, Ptr79, Ptr80, Ptr81, Ptr82, NA3-1, NA8-2, NA8-3, NA3-3, NA7-1, NA2-1, NA3-1, NA-4.2), la caractérisation phénotypique correspond à leur caractérisation génotypique.

En revanche, chez des isolats Ptr9, Ptr64, Ptr75, NA6-1, NA7-2, NA7-3 et NA7-4 la caractérisation génotypique des isolats par amplification des gènes ToxA et ToxB n'a pu confirmer les résultats obtenus lors des inoculations sur gamme d'hôte différentielle. Nous avons ainsi noté en particulier, une absence d'amplification du gène ToxA chez des isolats de race 7 (Ptr64, NA6-1, NA7-2, NA7-3 et NA7-4). De même que le gène ToxB n'a pu être amplifié chez Ptr9 et NA7-3 (race 7) et Ptr75 (race6). Or leurs inoculations respectives ont clairement induit des nécroses et chloroses sur les génotypes sensibles caractéristiques des races 6 et 7. Ceci pourrait être le résultat d'une ou plusieurs mutations ponctuelles au niveau des régions d'hybridation des amorces ; ce type de modification au niveau de l'ADN, n'est pas très important pour affecter l'expression du gène en question. Néanmoins, il est suffisant pour modifier les séquences des régions où les amorces sont destinées à être hybridées et empêcher ainsi l'amplification.

Ceci paraît encore plus vraisemblable pour le gène ToxB, puisque celui-ci est connu par sa variabilité dans le nombre des formes alléliques et la variabilité de séquences de ces formes, chez les isolats de même race. Ainsi 8 à 10 copies ont été identifiées chez la souche algérienne Alg3-24 appartenant à la race 5, (Strelkov et al, 2006) et 9 chez un isolat américain de la même race (Martinez et al., 2004). Le nombre de copies chez le gène ToxB et la variabilité des profils de restriction de ces différentes copies ont été décrit également chez les isolats des races 6,7 et 8 (Lamari et al., 2003). Enfin il est à noter que l'analyse de six copies de ce gène étudié par Martinez et al. (2004) a révélé la présence au niveau des séquences flanquant leur ORFs, de rétro-transposants. Ceci est un facteur supplémentaire qui peut être à l'origine de mutations dans cette région du génome.

Il est à signaler aussi que les amorces utilisées n'ont pas amplifié également le gène ToxB chez la race 4, résultat qui était prévisible. En effet la séquence de la forme allélique nommée *toxb* retrouvée chez la race 4 est différente des autres formes alléliques de ce gène. Elle présente des différences d'une part au niveau du promoteur et d'autre part au niveau de la région codante qui contrôle la synthèse de la protéine mature (Strelkov, 2002). Or, pendant le présent travail nous nous sommes intéressés justement à la région codante du gène ToxB. D'autres travaux ont établi la différence entre ToxB et

oxb ; Martinez et al. (2004) ont cloné et caractérisé le gène *toxb* à partir d'un isolat appartenant à la race 4 collecté au Nord du Dakota, et l'ont comparé avec six *loci* clonés à partir du génome d'un isolat de la race 5, collecté dans la même région géographique. Leurs résultats ont révélé que *toxb* de la race 4 ne présentait que 86% de similarité avec ToxB de la race 5. Strelkov et al. (2006), qui ont comparé *toxb* cloné d'un isolat de la race 4 isolée au Manitoba (Canada), à ToxB de la souche algérienne Alg3-24 de la race 5, ont abouti aux mêmes conclusions. Leurs résultats mettent en évidence un même niveau de similitude entre ToxB et *toxb* (86%).

Les différences obtenues entre les résultats des inoculations artificielles et ceux de l'identification moléculaire pour les isolats Ptr9, Ptr64, Ptr75, NA6-1, NA7-2, NA7-3 et NA7-4, pourraient également avoir une autre origine. L'expression de l'un des deux symptômes (chlorose ou nécrose) en absence du gène responsable de la synthèse de la toxine correspondante au symptôme exprimé, pourrait laisser penser à la présence de nouvelles toxines chez ces isolats, encore inconnues. Cette hypothèse impliquerait qu'il existerait chez le *P. tritici-repentis* des profils de virulence similaires à ceux des races connues, mais dont les facteurs de virulence seraient différents et non encore identifiés. En effet dans le système de ségrégation des races adopté actuellement, le nombre de races n'est limité que par la taille de la gamme différentielle. L'introduction de nouveaux génotypes pourrait mettre en évidence une plus grande variabilité chez cette espèce. Ces résultats et les suggestions auxquelles elles nous conduisent, s'orientent dans le même sens que les résultats rapportés par Ali et al. (2010). Ces derniers ont identifié 13 isolats pouvant induire des nécroses sur la variété Glenlea, mais chez qui l'analyse moléculaire par PCR et Southern-blot ont montré l'absence du gène ToxA. Ils suggèrent chez le *P. tritici-repentis* l'existence de composés toxiques induisant des phénotypes de la maladie chez la variété sensible Glenlea similaires à ceux provoqués par les races connues.

Des différences entre les résultats des profils de virulence et ceux obtenus par caractérisation moléculaire chez *P. tritici-repentis* ont déjà été rapportés. Andrieu et al. (2007), en utilisant la PCR multiplex, ont montré que certains isolats de ce champignon produisaient des profils de virulence identiques à d'autres isolats de races connues, alors qu'ils étaient génotypiquement différents. Ceci nous permet de conclure aux limites de cette méthode et de confirmer les insuffisances de cette approche, déjà discutée par Lamari et Strelkov (2010). Ces derniers rappellent que la méthode basée sur la PCR se focalise sur l'amplification de deux gènes qui codent la synthèse des deux toxines Ptr ToxA et Ptr ToxB. Or, des homologues de ces gènes existent aussi chez d'autres espèces et/ou d'autres races, ce qui rend difficile d'exclure la possibilité que d'autres formes de ces gènes soient amplifiées lorsque nous évaluons des isolats non caractérisés

auparavant. De plus l'existence d'autre(s) gène(s) responsable(s) de la synthèse de PtrToxC qui est (sont) encore non identifié(s), représente un obstacle supplémentaire à l'efficacité de cette démarche. Néanmoins une telle approche pourrait être utile pour confirmer les résultats lorsque les races sont identifiées (Lamari et Strelkov, 2010).

Afin de palier aux inconvénients qu'elle présente, nous proposons que l'amplification par PCR soit suivie par une hybridation moléculaire avec une sonde spécifique (Southern blot). Andrie et al. (2007), suggèrent deux méthodes pour améliorer l'efficacité de la caractérisation génotypique. La première consiste à confirmer les résultats de la PCR par un isolement de la toxine à partir du filtrat de culture, la seconde consiste à détecter la présence de la toxine dans le filtrat de culture par Western blot.

IV.8. Caractérisation moléculaire des isolats possédant les profils de virulence nouveaux :

Le gène *CHS* responsable de la synthèse de chitine synthétase a été amplifié chez l'ensemble des ADN analysés, aussi bien chez les souches de référence que chez les isolats étudiés.

L'amplification des gènes recherchés chez les ADN témoins a été positive. En effet ToxA a été mis en évidence chez les ADN des souches Pti2 et 86.124, correspondant respectivement aux races 1 et 2. De même, ToxB a été amplifié chez les ADN des souches 331.9 et DW7 correspondant aux races 3 et 5. La forme allélique *toxb* a aussi été amplifiée chez la souche 90.2 correspondant à la race 4. Ceci a permis de révéler l'efficacité des témoins positifs utilisés (Fig. 39).

Concernant les ADN des isolats étudiés, à savoir Ptr24, Ptr65, Ptr68 et Ptr76, les gènes recherchés ToxA et ToxB, ont été amplifiés par les amorces utilisées (Fig. 39). En effet chez les quatre isolats étudiés, il a été possible d'observer un fragment de 573 pb qui a été également amplifié chez l'ADN des races 1 et 2. Ce fragment correspond à presque la totalité de l'ORF du gène ToxA (Andrie et al., 2007). Par ailleurs, chez les quatre isolats étudiés, un fragment de 232 pb a été mis en évidence par la réaction PCR, celui-ci est également présent dans les produits d'amplification des races 3 et 5. Le produit d'amplification correspond à une portion de l'ORF du gène ToxB ainsi qu'à celle de son homologue présent chez la race 3 (Andrie et al., 2007).

Par contre, les amplifications réalisées n'ont pas révélé la présence de *toxb* chez aucun des isolats présentant le nouveau profil de virulence (Fig. 39).

Par conséquent les gènes ToxA et ToxB sont présents dans les génomes des isolats étudiés mais pas *toxb*. La présence des deux gènes ToxA et ToxB, malgré l'absence des symptômes habituellement induits par leurs produits, laisse supposer l'existence d'homologues pour ces deux gènes non connus encore.

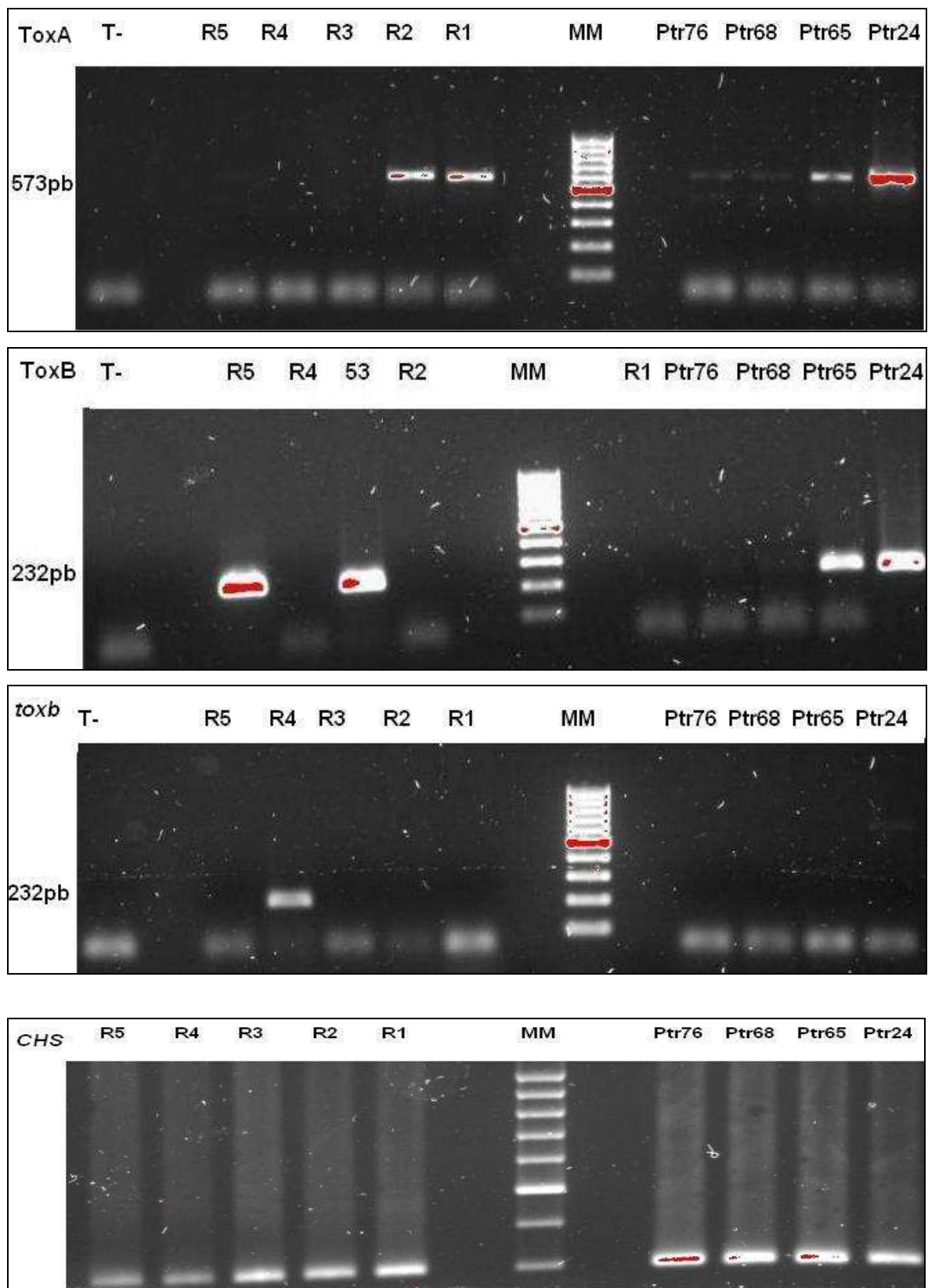


Figure 39 : Amplification des gènes *ToxA*, *ToxB*, *toxB* et *CHS* chez les isolats Ptr24, Ptr65, Ptr68 et Ptr76.

L'alignement des séquences obtenues après séquençage des fragments amplifiés pour chacun des deux gènes ToxA et ToxB a été comme suit :

	1	10	20	30	40	50	60
Tox A	AAAGCGTAATCACCAAAAAGCTCATAAACGTCCCCCGAGTGACAGTATTAGTAGTATAA						
Ptr65F	AAAGCGTAATCACCAAAAAGCTCATAAACGTCCCCCGAGTGACAGTATTAGTAGTATAA						
Ptr24F	AAAGCGTAATCACCAAAAAGCTCATAAACGTCCCCCGAGTGACAGTATTAGTAGTATAA						
Ptr65R	AAAGCGTAATCACCAAAAAGCTCATAAACGTCCCCCGAGTGACAGTATTAGTAGTATAA						
Ptr24R	AAAGCGTAATCACCAAAAAGCTCATAAACGTCCCCCGAGTGACAGTATTAGTAGTATAA						
Ptr68R	AAAGCGTAATCACCAAAAAGCTCATAAACGTCCCCCGAGTGACAGTATTAGTAGTATAA						
Ptr76R	AAAGCGTAATCACCAAAAAGCTCATAAACGTCCCCCGAGTGACAGTATTAGTAGTATAA						
Ptr76F	AAAGCGTAATCACCAAAAAGCTCATAAACGTCCCCCGAGTGACAGTATTAGTAGTATAA						
Ptr68F	AAAGCGTAATCACCAAAAAGCTCATAAACGTCCCCCGAGTGACAGTATTAGTAGTATAA						
ToxA	GTTAGTAATAAGTAATCTAATAAAATGGTGGGGAGACTTATTCCTTGGAGTAATAATGA						
Ptr65F	GTTAGTAATAAGTAATCTAATAAAATGGTGGGGAGACTTATTCCTTGGAGTAATAATGA						
Ptr24F	GTTAGTAATAAGTAATCTAATAAAATGGTGGGGAGACTTATTCCTTGGAGTAATAATGA						
Ptr65R	GTTAGTAATAAGTAATCTAATAAAATGGTGGGGAGACTTATTCCTTGGAGTAATAATGA						
Ptr24R	GTTAGTAATAAGTAATCTAATAAAATGGTGGGGAGACTTATTCCTTGGAGTAATAATGA						
Ptr68R	GTTAGTAATAAGTAATCTAATAAAATGGTGGGGAGACTTATTCCTTGGAGTAATAATGA						
Ptr76R	GTTAGTAATAAGTAATCTAATAAAATGGTGGGGAGACTTATTCCTTGGAGTAATAATGA						
Ptr76F	GTTAGTAATAAGTAATCTAATAAAATGGTGGGGAGACTTATTCCTTGGAGTAATAATGA						
Ptr68F	GTTAGTAATAAGTAATCTAATAAAATGGTGGGGAGACTTATTCCTTGGAGTAATAATGA						
ToxA	GGCGATTAGTCCTGCCGGTGTTTCGGATGTTGACTCGCACTGTATCGGCGTTTACGCGGT						
Ptr65F	GGCGATTAGTCCTGCCGGTGTTTCGGATGTTGACTCGCACTGTATCGGCGTTTACGCGGT						
Ptr24F	GGCGATTAGTCCTGCCGGTGTTTCGGATGTTGACTCGCACTGTATCGGCGTTTACGCGGT						
Ptr65R	GGCGATTAGTCCTGCCGGTGTTTCGGATGTTGACTCGCACTGTATCGGCGTTTACGCGGT						
Ptr24R	GGCGATTAGTCCTGCCGGTGTTTCGGATGTTGACTCGCACTGTATCGGCGTTTACGCGGT						
Ptr68R	GGCGATTAGTCCTGCCGGTGTTTCGGATGTTGACTCGCACTGTATCGGCGTTTACGCGGT						
Ptr76R	GGCGATTAGTCCTGCCGGTGTTTCGGATGTTGACTCGCACTGTATCGGCGTTTACGCGGT						
Ptr76F	GGCGATTAGTCCTGCCGGTGTTTCGGATGTTGACTCGCACTGTATCGGCGTTTACGCGGT						
Ptr68F	GGCGATTAGTCCTGCCGGTGTTTCGGATGTTGACTCGCACTGTATCGGCGTTTACGCGGT						
ToxA	TCAATCCAATGGTAATAAAGTTGTTTCAGTTCACGAGCCTATAGCACCAGGTTCGTCCGA						
Ptr65F	TCAATCCAATGGTAATAAAGTTGTTTCAGTTCACGAGCCTATAGCACCAGGTTCGTCCGA						
Ptr24F	TCAATCCAATGGTAATAAAGTTGTTTCAGTTCACGAGCCTATAGCACCAGGTTCGTCCGA						
Ptr65R	TCAATCCAATGGTAATAAAGTTGTTTCAGTTCACGAGCCTATAGCACCAGGTTCGTCCGA						
Ptr24R	TCAATCCAATGGTAATAAAGTTGTTTCAGTTCACGAGCCTATAGCACCAGGTTCGTCCGA						
Ptr68R	TCAATCCAATGGTAATAAAGTTGTTTCAGTTCACGAGCCTATAGCACCAGGTTCGTCCGA						
Ptr76R	TCAATCCAATGGTAATAAAGTTGTTTCAGTTCACGAGCCTATAGCACCAGGTTCGTCCGA						
Ptr76F	TCAATCCAATGGTAATAAAGTTGTTTCAGTTCACGAGCCTATAGCACCAGGTTCGTCCGA						
Ptr68F	TCAATCCAATGGTAATAAAGTTGTTTCAGTTCACGAGCCTATAGCACCAGGTTCGTCCGA						
ToxA	GTATAACACTGTCAATGTCGACTTGGCCGATGTTGTTGACAGACGGACGACTAGGGTTGA						
Ptr65F	GTATAACACTGTCAATGTCGACTTGGCCGATGTTGTTGACAGACGGACGACTAGGGTTGA						
Ptr24F	GTATAACACTGTCAATGTCGACTTGGCCGATGTTGTTGACAGACGGACGACTAGGGTTGA						
Ptr65R	GTATAACACTGTCAATGTCGACTTGGCCGATGTTGTTGACAGACGGACGACTAGGGTTGA						
Ptr24R	GTATAACACTGTCAATGTCGACTTGGCCGATGTTGTTGACAGACGGACGACTAGGGTTGA						
Ptr68R	GTATAACACTGTCAATGTCGACTTGGCCGATGTTGTTGACAGACGGACGACTAGGGTTGA						
Ptr76R	GTATAACACTGTCAATGTCGACTTGGCCGATGTTGTTGACAGACGGACGACTAGGGTTGA						
Ptr76F	GTATAACACTGTCAATGTCGACTTGGCCGATGTTGTTGACAGACGGACGACTAGGGTTGA						
Ptr68F	GTATAACACTGTCAATGTCGACTTGGCCGATGTTGTTGACAGACGGACGACTAGGGTTGA						
ToxA	TTGTGATTGACATGCAGCTTCCCTGCCGCTCCTGTAGGAGTCCGCGCGGTTTGAGGGTCC						
Ptr65F	TTGTGATTGACATGCAGCTTCCCTGCCGCTCCTGTAGGAGTCCGCGCGGTTTGAGGGTCC						
Ptr24F	TTGTGATTGACATGCAGCTTCCCTGCCGCTCCTGTAGGAGTCCGCGCGGTTTGAGGGTCC						
Ptr65R	TTGTGATTGACATGCAGCTTCCCTGCCGCTCCTGTAGGAGTCCGCGCGGTTTGAGGGTCC						
Ptr24R	TTGTGATTGACATGCAGCTTCCCTGCCGCTCCTGTAGGAGTCCGCGCGGTTTGAGGGTCC						
Ptr68R	TTGTGATTGACATGCAGCTTCCCTGCCGCTCCTGTAGGAGTCCGCGCGGTTTGAGGGTCC						
Ptr76R	TTGTGATTGACATGCAGCTTCCCTGCCGCTCCTGTAGGAGTCCGCGCGGTTTGAGGGTCC						
Ptr76F	TTGTGATTGACATGCAGCTTCCCTGCCGCTCCTGTAGGAGTCCGCGCGGTTTGAGGGTCC						
Ptr68F	TTGTGATTGACATGCAGCTTCCCTGCCGCTCCTGTAGGAGTCCGCGCGGTTTGAGGGTCC						
ToxA	AGTCGAGAGAGAGTCCGCGCGCGTCGAGTTTCTAGAGAGTTGGCGGCTTCGAAAAG						
Ptr65F	AGTCGAGAGAGAGTCCGCGCGCGTCGAGTTTCTAGAGAGTTGGCGGCTTCGAAAAG						
Ptr24F	AGTCGAGAGAGAGTCCGCGCGCGTCGAGTTTCTAGAGAGTTGGCGGCTTCGAAAAG						
Ptr65R	AGTCGAGAGAGAGTCCGCGCGCGTCGAGTTTCTAGAGAGTTGGCGGCTTCGAAAAG						
Ptr24R	AGTCGAGAGAGAGTCCGCGCGCGTCGAGTTTCTAGAGAGTTGGCGGCTTCGAAAAG						
Ptr68R	AGTCGAGAGAGAGTCCGCGCGCGTCGAGTTTCTAGAGAGTTGGCGGCTTCGAAAAG						
Ptr76R	AGTCGAGAGAGAGTCCGCGCGCGTCGAGTTTCTAGAGAGTTGGCGGCTTCGAAAAG						
Ptr76F	AGTCGAGAGAGAGTCCGCGCGCGTCGAGTTTCTAGAGAGTTGGCGGCTTCGAAAAG						
Ptr68F	AGTCGAGAGAGAGTCCGCGCGCGTCGAGTTTCTAGAGAGTTGGCGGCTTCGAAAAG						

ToxA = séquence de référence (gi|2209140|gb|AF004369.1|)

	1	10	20	30	40	50	60
Ptr24 R	GTTATTGCGACTGGCTGTGTCCCAGCTGGAGGGGAGCTTCGCATATTCGTGGGTAGTAGC						
Ptr65 R	GTTATTGCGACTGGCTGTGTCCCAGCTGGAGGGGAGCTTCGCATATTCGTGGGTAGTAGC						
Ptr68 R	GTTATTGCGACTGGCTGTGTCCCAGCTGGAGGGGAGCTTCGCATATTCGTGGGTAGTAGC						
Ptr76 R	GTTATTGCGACTGGCTGTGTCCCAGCTGGAGGGGAGCTTCGCATATTCGTGGGTAGTAGC						
Ptr68 F	GTTATTGCGACTGGCTGTGTCCCAGCTGGAGGGGAGCTTCGCATATTCGTGGGTAGTAGC						
Ptr76 F	GTTATTGCGACTGGCTGTGTCCCAGCTGGAGGGGAGCTTCGCATATTCGTGGGTAGTAGC						
Ptr24 F	GTTATTGCGACTGGCTGTGTCCCAGCTGGAGGGGAGCTTCGCATATTCGTGGGTAGTAGC						
Ptr65 F	GTTATTGCGACTGGCTGTGTCCCAGCTGGAGGGGAGCTTCGCATATTCGTGGGTAGTAGC						
ToxB	GTTATTGCGACTGGCTGTGTCCCAGCTGGAGGGGAGCTTCGCATATTCGTGGGTAGTAGC						
Ptr24 R	CATAGCTATTTGATTAAGGCTACAAGCTCCTGTGGTCTCAGCC						
Ptr65 R	CATAGCTATTTGATTAAGGCTACAAGCTCCTGTGGTCTCAGCC						
Ptr68 R	CATAGCTATTTGATTAAGGCTACAAGCTCCTGTGGTCTCAGCC						
Ptr76 R	CATAGCTATTTGATTAAGGCTACAAGCTCCTGTGGTCTCAGCC						
Ptr68 F	CATAGCTATTTGATTAAGGCTACAAGCTCCTGTGGTCTCAGCC						
Ptr76 F	CATAGCTATTTGATTAAGGCTACAAGCTCCTGTGGTCTCAGCC						
Ptr24 F	CATAGCTATTTGATTAAGGCTACAAGCTCCTGTGGTCTCAGCC						
Ptr65 F	CATAGCTATTTGATTAAGGCTACAAGCTCCTGTGGTCTCAGCC						
ToxB	CATAGCTATTTGATTAAGGCTACAAGCTCCTGTGGTCTCAGCC						

ToxB = sequence de reference (gi|46576199|gb|AY425485.1|)

Ainsi, l'alignement des huit séquences (sens et anti-sens) obtenues chez les deux gènes ToxA et ToxB après correction et raccourcissement, puis leur comparaison avec leurs séquences de référence respectives, ne montre aucune différence. La partie séquencée des deux gènes responsables de la production des toxines PtrToxA et PtrToxB ne montre aucune différence chez les quatre isolats étudiés, et ne présente également aucune différence avec les séquences de référence.

L'analyse des séquences des gènes ToxA et ToxB obtenues pour les isolats Ptr24, Ptr65, Ptr68 et Ptr76, n'a pas révélé de différences apparentes avec celles des deux gènes fonctionnels connus, et codant respectivement pour les toxines PtrToxA et PtrToxB. Les séquences obtenues suite au séquençage des ADN amplifiés, ne présentent aucune mutation. Par conséquent, les isolats étudiés ayant montré un nouveau profil de virulence indiquant l'absence des produits des gènes ToxA et ToxB, possèdent des gènes identiques aux gènes fonctionnels, pour la région étudiée. Toutefois, cette dernière a été limitée à une partie restreinte du gène ; la présence d'une ou plusieurs mutations ponctuelles dans une autre région de chacun des deux gènes est fortement à considérer. Les amorces utilisées amplifient uniquement des portions des deux gènes à l'intérieur des ORFs (Open Reading Frames) ; pour le gène ToxA, la région amplifiée correspond à 573 pb et pour ToxB à 232 pb (Andrieu *et al.*, 2007). De plus, les portions des gènes réellement ciblées après séquençage, se trouvent plus réduites en raison des erreurs de séquençage ayant amené à raccourcir les séquences analysées.

Ainsi la séquence analysée pour le gène ToxA a été de 415 pb et pour ToxB de 103 pb (Figure 40).

Par ailleurs, une mutation en amont de la séquence étudiée, située en début de la région codante pourrait expliquer l'absence des produits des deux gènes. Dans certains cas il a été possible d'observer à ce niveau des substitutions identiques qui se répètent chez des isolats différents et à la même position. Ces mutations présumées ont été notées sur des séquences anti-sens (reverse). Toutefois il n'a pas été possible de vérifier leur présence sur le brin sens (forward), en raison de la longueur réduite de la séquence. Cet état de fait ne nous permet pas de valider ces mutations supposées.

Une autre hypothèse qui pourrait expliquer l'absence d'expression, est la présence d'une ou plusieurs mutations au niveau des promoteurs ; leur présence peut modifier l'expression des deux gènes voire l'annuler complètement. Des cas similaires ont déjà été décrits chez *P. tritici-repentis* ; tel est le cas de *tox*b retrouvé chez la race 4. Cette forme allélique du gène ToxB, présente des différences d'une part au niveau du promoteur et d'autre part au niveau de la région codante qui contrôle la synthèse de la protéine mature (Strelkov, 2002) ; le gène *tox*b est exprimé très faiblement (Amaike *et al.*, 2008). Un autre homologue du gène ToxB a été aussi identifié chez des isolats représentant la races 3 chez qui aucune activité détectable de la toxine Ptr ToxB n'est connue (Martinez *et al.*, 2004 ; Strelkov *et al.*, 2006).

Cependant, jusqu'à maintenant aucun homologue du gène ToxA incapable de produire la toxine PtrToxA n'a été encore décrit ; ce gène localisé sur un chromosome de 3Mb (Lichter *et al.*, 2002) , est connu pour être présent en copie unique chez toutes les races de *P. tritici-repentis* produisant la Ptr ToxA , alors qu'il apparait complètement absent chez les autres races non productrices de cette toxine. Plusieurs travaux ont montré que ToxA semble être très conservé chez les isolats collectés à partir de différentes régions géographiques (Ballance *et al.*, 1996 ; Ciuffetti *et al.*, 1997 ; Friesen, 2006). Le seul homologue de ce gène connu, a été découvert chez *Stagonospora nodorum* (Berk) E. Castell. et Germano, agent de la moucheture du blé (séptoriose) (Friesen, 2006). La présence d'un homologue du gène ToxA chez *P. tritici-repentis* est une première.

Considérant la nature biochimique et la voie de biosynthèse des toxines PtrToxA et PtrToxB, plusieurs causes peuvent être à l'origine de l'absence d'expression des gènes ToxA et ToxB observées chez les isolats Ptr24, Ptr65, Ptr68 et Ptr Ptr76. Le clonage du gène ToxA, a révélé qu'il codait au préalable pour une pro-protéine de 19,7kDa qui subit

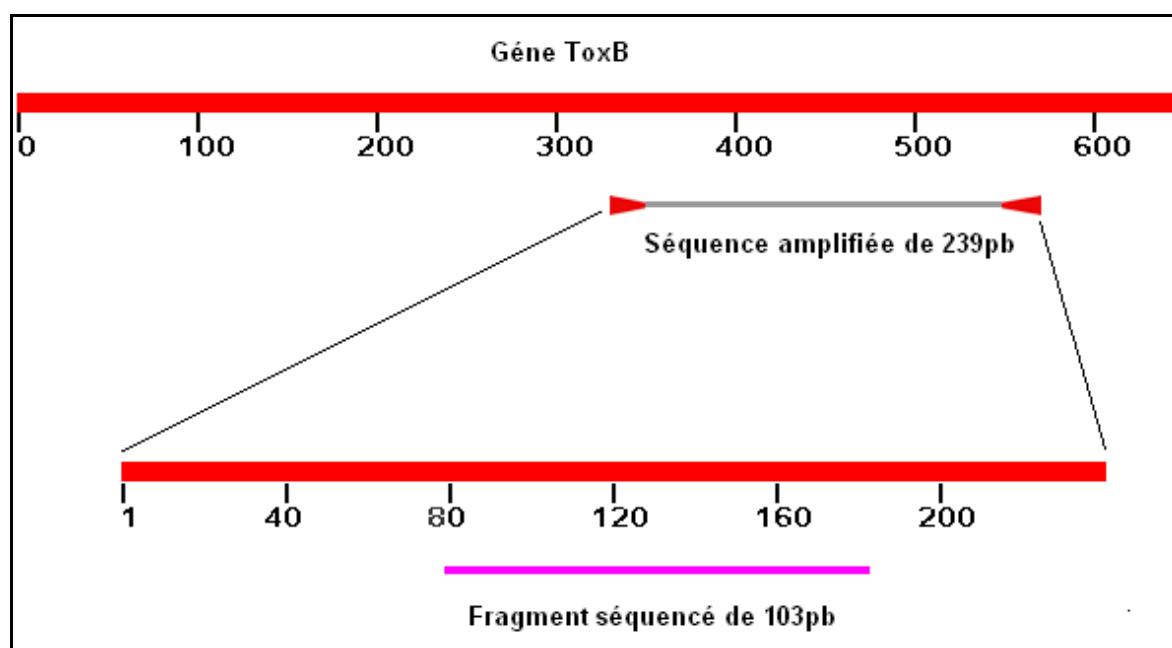
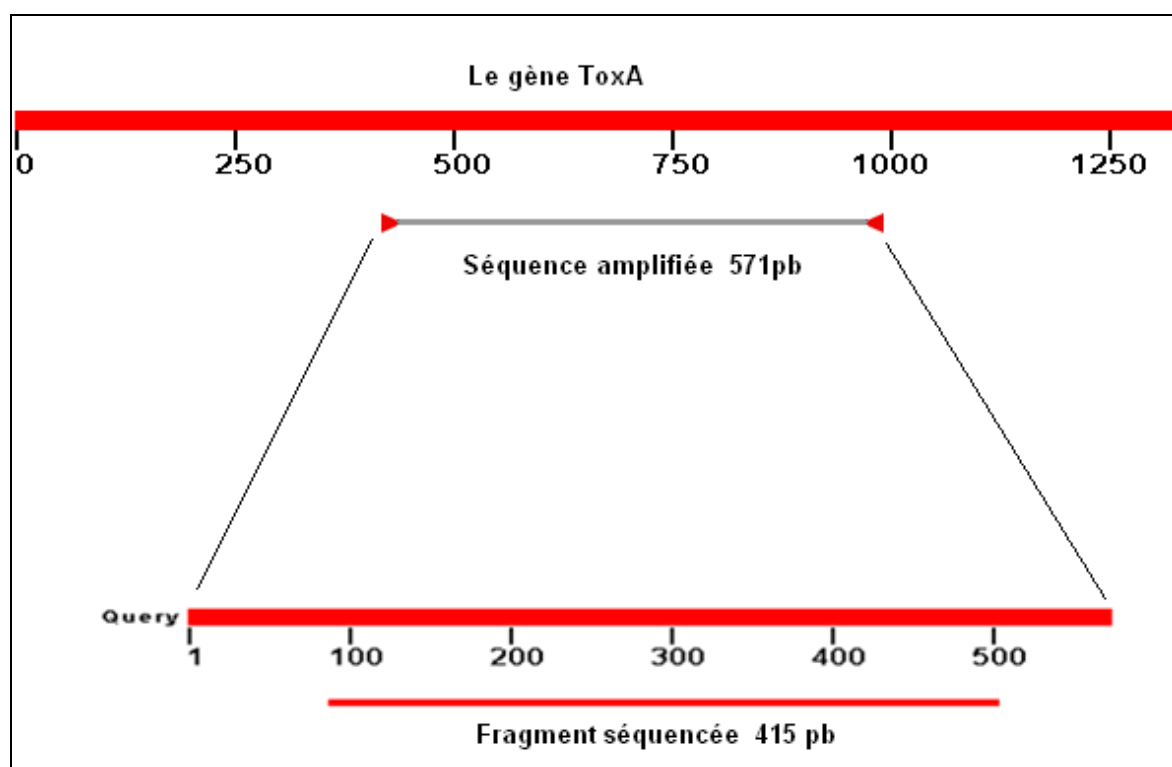


Figure 40 : Parties des gènes ToxA et ToxB séquencées

par la suite une maturation impliquant le clivage d'un polypeptide d'environ 22 acides aminés, produisant ainsi la toxine mature (Ballance *et al.*, 1996 ; Ciuffetti *et al.*, 1997). De même la toxine PtrToxB contrôlée par le gène ToxB, est une protéine de bas poids moléculaire, de 6,6 kDa (Strelkov *et al.*, 1999). Le clonage de ce dernier gène a montré qu'il codait pour une pro-protéine de 87 acides aminés, qui après un clivage et la perte d'un polypeptide de 23 acides aminés, aboutit à la toxine active de 64 résidus (Martinez *et al.*, 2001. Strelkov, 2002).

Il apparaît ainsi que la synthèse des toxines peut être affectée par les différents facteurs contrôlant la biosynthèse d'une protéine chez les organismes eucaryotes. L'expression des gènes correspondants étant soumise à une régulation temporelle et spatiale fine et complexe, ouvre plusieurs voies d'investigations. Toute une série de possibilités s'enchaînent, depuis une structure particulière de la chromatine (niveau élevé de régulation) jusqu'à une régulation post traductionnelle (dernier stade possible de régulation). Les origines de la répression de ces gènes peuvent se manifester à cinq niveaux différents : l'état de la chromatine, lors de la transcription, au stade post transcriptionnel, durant la traduction de l'ARNm ou encore après la traduction de ce dernier en protéine.

L'environnement chromatinien des gènes ToxA et ToxB est un premier niveau à considérer. Celui des gènes dits « actifs » chez les organismes eucaryotes, se trouve dans une conformation chromatinienne particulière qui les rend plus accessibles à certaines protéines comme l'ARN polymérase ou encore les protéines régulatrices de la transcription (Keplan et Delpech, 1992 ; Moore et Novak Frazee, 2002). Les gènes qui doivent être transcrits par la cellule, doivent être dans une configuration spatiale particulière ; une défaillance à ce niveau aurait pu bloquer l'expression des deux gènes étudiés.

Keplan et Delpech (1992), rapportent que la régulation de l'expression des gènes eucaryotes peut être aussi sous la dépendance d'une modification de la structure primaire de l'ADN. Elles peuvent être de simples modifications chimiques comme une méthylation ou une véritable reconfiguration. Une série de résultats a montré que la méthylation des cytosines situées dans la région en 5' non transcrit des gènes est associée à une diminution de leur activité transcriptionnelle. La méthylation semble donc être un signal de fermeture des gènes eucaryotes, ce phénomène a déjà été signalé chez les champignons filamenteux. Ainsi chez *Ascobolus immersus* (Barry *et al.*, 1993) et chez *Neurospora crassa* (Rountree and Selker, 1997), la méthylation de l'ADN induisait la réduction de l'élongation de l'ARNm. Chez *Schizophyllum commune*, il a été aussi montré

que la méthylation induit la réduction de l'expression de certains gènes en affectant la transcription (Schuurs *et al.*, 1997).

Le niveau transcriptionnel est également à tenir en compte ; dans la plupart des systèmes étudiés, chez les champignons filamenteux la transcription est contrôlée au moins à deux niveaux. Le premier est représenté par les protéines spécifiques dont certains domaines interagissent avec des séquences spécifiques de l'ADN pour s'y lier et par conséquent, activer les gènes concernés. Le second est plus global et concerne par exemple la régulation du carbone ou du nitrogène. L'interaction entre ces différents niveaux de contrôle, est le premier facteur qui détermine la nature du produit protéique final (MacKenzie *et al.*, 1993). Les possibilités expliquant l'inhibition des gènes ToxA et ToxB lors de la transcription sont donc nombreuses. Ceci étant plus vraisemblable qu'une large proportion des protéines impliquées lors de la transcription des gènes eucaryotes ont été identifiées chez *Saccharomyces cerevisiae* (Moore and Novak Frazer, 2002). La défaillance de l'une d'entre elles (facteurs de transcription) pourrait entraîner aisément l'inhibition des gènes auxquels nous nous sommes intéressés.

Au stade post-transcriptionnelle, la répression de l'expression de ToxA et ToxB pourrait trouver son origine dans les phénomènes de maturation du transcrit primaire. Parmi ces phénomènes, l'épissage est à considérer car l'épissage alternatif peut affecter l'expression des gènes eucaryotes. Il est à noter dans ce contexte, que même si peu de choses sont connues sur les détails de ce mécanisme chez les champignons filamenteux (Sachs, 1998), ces derniers possèdent un mécanisme d'épissage de l'ARNm semblable à celui rencontré chez les autres eucaryotes (Tollervey and Mattaj, 1987; Tollervey *et al.*, 1990; Séraphin, 1995). La présence d'un intron devant être éliminé ou au contraire, l'absence d'un intron devant être conservé au niveau de l'ARNm mature, peut affecter l'expression d'un gène chez ce type de champignons (Sachs, 1998).

Ainsi, chez *Tolypocladium inflatum*, il a été montré qu'un épissage alternatif de l'ARN correspondant à l'ADN de l'élément transposable *restless*, implique la production de deux transcrits différents possédant des capacités d'expressions différentes (Kempken and Kück, 1996). De même qu'une mutation produisant l'annulation de l'épissage de l'intron *REC1* chez l'espèce *Ustilago maydis* induit la synthèse d'un produit de gène ayant perdu sa fonction initiale qui est la sensibilité aux radiations (Onel *et al.*, 1995). Alors que dans certains cas c'est plutôt l'élimination d'un intron primordial qui induit la déficience du produit du gène ; comme il a été rapporté chez l'espèce *Podospora anserina*. Chez cette dernière la conservation d'un certain intron au niveau du transcrit du gène *AS1* lors de l'épissage, est indispensable à la production fonctionnelle de la protéine ribosomique S12 (Dequard-Chabat and Rotig, 1997).

De telles situations peuvent être envisageables dans le cas étudié ; un épissage alternatif chez les transcrits primaires des gènes ToxA et ToxB aurait pu induire la production d'ARNm mature traduits en des protéines différentes de celles attendues, à savoir PtrToxA et PtrToxB.

Toujours à ce niveau de la régulation, il est à rappeler que le taux de synthèse d'une protéine par le système cytoplasmique de traduction est en partie fonction de la concentration instantanée de l'ARNm correspondant. Il a été établi que la modification de la durée de vie des messagers (donc de leur stabilité) était un facteur important de la régulation de certains gènes (Keplan et Delpech, 1992). Parmi les champignons filamenteux, il existe des cas où la stabilité de l'ARNm est contrôlée par la région 3'UTR du gène en question tel qu'il est décrit chez l'espèce *Aspergillus nidulans* (Platt et al., 1996). Pour d'autres gènes chez cette même espèce, le degré de poly-adénilation de l'ARNm serait à l'origine de sa stabilité. Ce phénomène pouvant être influencé par plusieurs protéines cytoplasmiques (Marhoul et Dams, 1996). Cet état de fait, nous laisse supposer également que l'absence de l'expression des deux gènes étudiés (ToxA et ToxB) pourrait trouver une explication aussi bien au niveau du gène, qu'au niveau d'autres gènes contrôlant l'expression de plusieurs protéines. Celles-ci dirigent différents phénomènes ayant trait aux mécanismes d'expression des gènes ToxA et ToxB.

Par ailleurs, aussi rare soit-il le phénomène du « gène silencing » n'est pas à exclure de notre investigation. En effet l'extinction du gène est un processus épigénique empêchant la production d'une protéine. Lorsqu'il affecte l'ARNm, il empêche la traduction, d'autant plus que plusieurs cas ont été rapportés chez les champignons. Chez *Neurospora crassa*, il existe des évidences que ce phénomène, à travers la présence de copies supplémentaires de gènes ou des fragments de ces gènes, peut se produire à un niveau post transcriptionnel. Il est très probable qu'il affecte ainsi la stabilité de l'ARN (Cogoni et al, 1996).

La traduction des ARNm chez les organismes eucaryotes est aussi sous la dépendance de plusieurs facteurs protéiques. Le niveau de la traduction peut diminuer considérablement en réponse à plusieurs conditions, ce qui peut inhiber les facteurs d'initiation de la traduction (Malacinski et Freifelder, 1998).

Le dernier niveau où pourrait se trouver les causes de l'absence d'expression des deux gènes, se situe dans les modifications pouvant toucher les acides aminés après la traduction du transcrit. En effet, certaines de ces modifications qui surviennent à un stade post-traductionnel peuvent avoir des conséquences déterminantes sur l'activité de la protéine synthétisée (Malacinski et Freifelder, 1998).

IV.9. Analyse de la diversité génétique chez *P. tritici-repentis* par marqueurs AFLP:

L'analyse de la diversité génétique chez *P. tritici-repentis* a été effectuée grâce à la technique AFLP. Cette analyse a concerné 61 isolats provenant de différentes régions céréalières du pays. L'ADN génomique a été digéré par les enzymes de restriction MseI et EcoRI. Au total, 78 couples d'amorce ont été testés, parmi lesquelles, 12 ont été sélectionnées pour cette étude. Leur choix est justifié par le nombre de bandes générées et le degré de polymorphisme mis en évidence. La séparation des fragments générés a été possible par une électrophorèse capillaire par le système PRISM® 3100 Genetic Analyzer de Applied Biosystems.

Les 12 combinaisons d'amorces étudiées ont permis de générer chez l'ensemble des ADN analysés 1251 bandes (*loci*) soit une moyenne de 104,25 par couple d'amorces, leur taille a varié entre 50 pb et 500 pb. L'ensemble des bandes se regroupe en profils qui révèlent la présence dans la population étudiée, de 61 haplotypes différents ; ainsi chacun des isolats étudiés exhibe un haplotype différent des autres isolats. La valeur moyenne de l'indice de diversité (DI) calculé sur la base de la moyenne des indices de diversité de chaque *locus* a été estimée à 0,145. Les valeurs du DI pour chacun des locus ont varié entre 0,03 et 0,5.

La totalité des bandes obtenues sont polymorphes dont aucune bande monomorphe n'a été mise en évidence. Le maximum de bandes a été généré suite à l'amplification par les amorces constituant la combinaison C45 avec 274 bandes alors que le minimum est obtenu suite à l'utilisation de la combinaison C70 avec seulement 81 bandes (Tab. XXII)

Tableau **XXII**: Nombre de *loci* (bandes) générés par chaque combinaison d'amorces et valeur moyenne du PIC pour chacune de ces combinaisons

Code de la combinaison d'amorces	Nombre de bandes (<i>loci</i>) générés	Valeur moyenne du PIC	Valeur maximale du PIC	Valeur minimale du PIC
C2	83	0,11968884	0,37439459	0,03172938
C3	98	0,12940572	0,3749328	0,03172938
C11	104	0,14982498	0,37388642	0,03224059
C21	102	0,13807434	0,3716862	0,03172938
C23	129	0,1319415	0,3749328	0,03172938
C45	274	0,12022048	0,37439459	0,03172938
C50	150	0,13222671	0,3749328	0,03172938
C51	89	0,09916783	0,37472207	0,03224059
C59	98	0,12447819	0,3743528	0,03276852
C60	125	0,11367889	0,375	0,03224059
C70	81	0,15681037	0,37472207	0,03224059
C78	103	0,12177006	0,375	0,03224059

Le nombre de *loci* révélé par isolat a varié entre 22 et 276 dont certains de ces *loci* étaient plus fréquents que d'autres dans la population étudiée. En effet alors que certains

se sont révélés présents chez presque la totalité des isolats étudiés, d'autres n'ont été mis en évidence que chez un seul isolat. Ainsi nous pouvons constater par exemple que le marqueur A1175 amplifié par le couple d'amorce C60 de 154 pb est retrouvé dans le génome de 58 isolats étudiés. De même, deux marqueurs dont la taille est respectivement, de 317 pb et 351pb mis en évidence par la même combinaison d'amorces se sont révélés présents chez 57 isolats. Enfin ces mêmes amorces ont révélé également un marqueur de 119 pb qui est retrouvé chez 56 isolats. Par ailleurs 478 marqueurs ne sont présents que chez un seul isolat de la collection analysée.

Les valeurs du PIC (contenu informatif du polymorphisme) pour chaque marqueur (*locus*), ont varié entre 0,0317 et 0,375. L'analyse des 1251 valeurs a permis de les subdiviser en 28 classes de valeurs ; l'importance du nombre de *loci* pour chaque valeur est exprimée par la figure 41. A travers cette dernière, nous pouvons constater près de 500 *loci*, ce qui représente presque 50% des marqueurs révélés, présentent une valeur du PIC faible de l'ordre de 0,0317, alors que la valeur du PIC la plus élevée est retrouvée chez uniquement 40 *loci* parmi les 1251 mis en évidence. Le nombre de marqueurs ayant présenté une valeur du PIC supérieure à 0,25 est de 249.

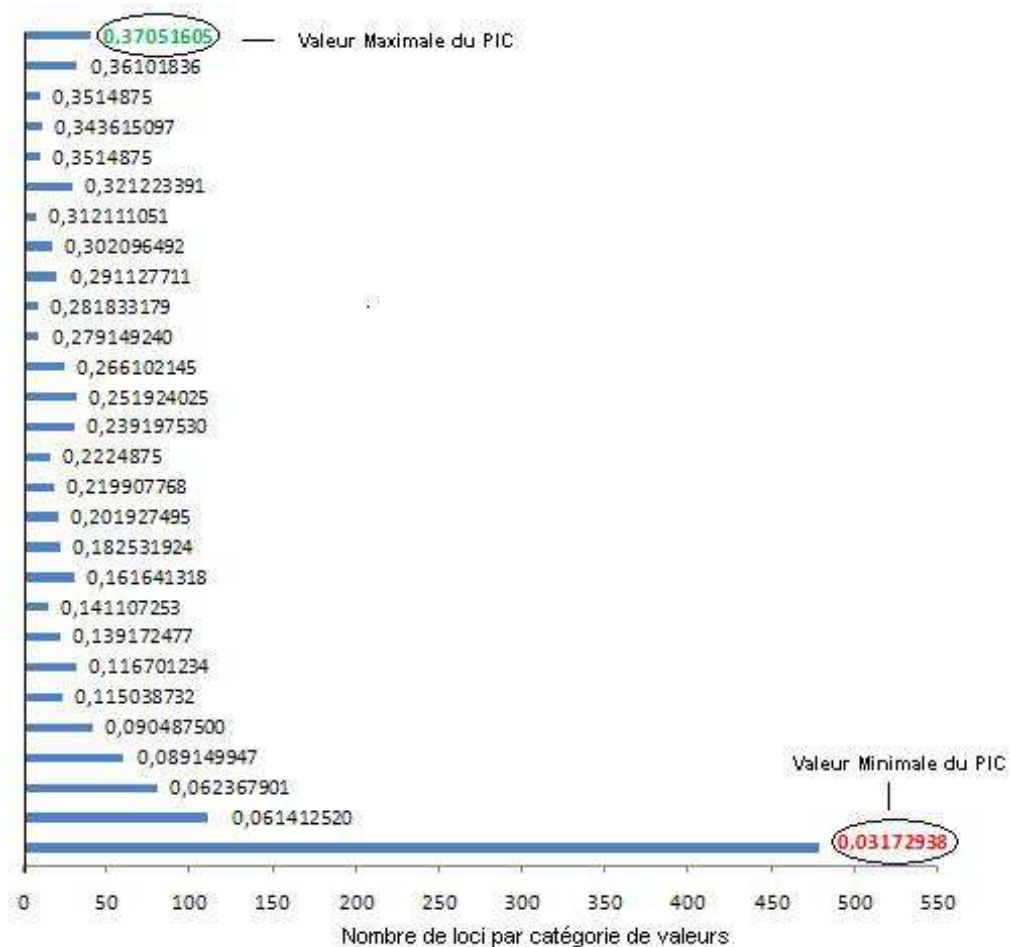


Figure 41 : Comparaison du nombre de *loci* révélés pour chaque valeur de PIC

Les valeurs moyennes pour chacune des combinaisons d'amorces utilisées sont réunies dans le tableau XXII ; l'importance de chacune de ces moyennes est représentée par la figure 42.

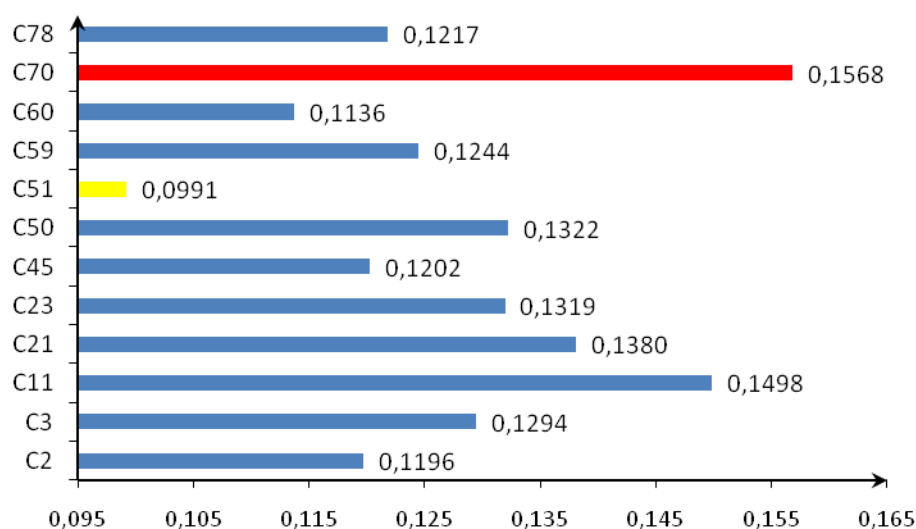


Figure 42 : Comparaison entre les valeurs moyennes du PIC des *loci* amplifiés par chacune des combinaisons d'amorces

L'analyse de ces résultats, montre que la combinaison d'amorces C70 est celle qui permet d'amplifier les *loci* qui présentent la valeur moyenne du PIC la plus élevée, alors que la combinaison d'amorces C51 au contraire, amplifie les *loci* qui possèdent la valeur moyenne du PIC la plus faible. La combinaison d'amorces C11 permet également de mettre en évidence des marqueurs possédant en moyenne des valeurs se rapprochant du maximum trouvé (Fig. 42).

L'analyse hiérarchique basée sur la distance génétique met en évidence deux grands ensembles à un niveau de similarité de 6%. Cette discrimination se trouve renforcée par le test bootstrap qui révèle une valeur de 100% au nœud en question sur l'arbre phylogénétique. Le premier groupe est formé par un seul isolat Ptr30, ce dernier a été isolé à partir de blé dur dans la région de Tizi-ouzou. Le second groupe réunit le reste de la collection étudiée ; à l'intérieur de cet ensemble nous pouvons identifier plusieurs groupes à différents niveaux de dépendance (Fig. 43). L'isolat Ptr24 se distingue dans cet ensemble en formant un groupe à part, qui ne présente que 8% de similitude avec le reste des isolats. Cet isolat provenant de blé dur s'est distingué lors de l'identification des races par un profil de virulence nouveau qui ne correspond à aucune des huit races connues. L'isolat Ptr24 fait partie des cinq isolats qui ne semblent attaquer que les génotypes de blé dur composant la gamme d'hôte différentielle et que nous avons proposé ériger en une 9^{ème} race.

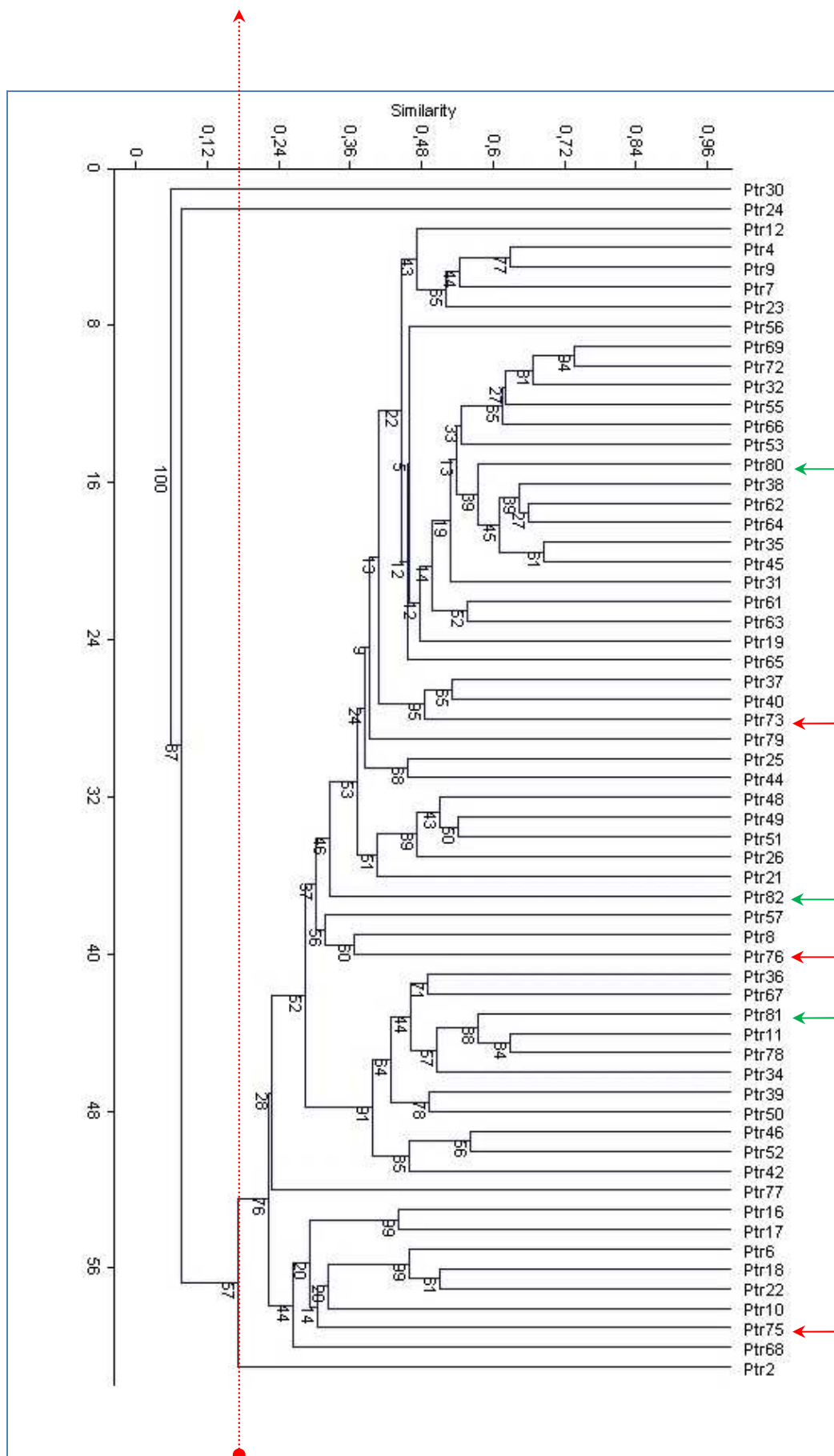


Figure 43 : Dendrogramme généré sur la base des distances de similarité de Jaccard montrant la classification hiérarchique de l'ensemble des isolats de la collection analysée

Les différents groupements révélés sur le dendrogramme ne peuvent être expliqués par l'origine géographique ; nous constatons que des isolats provenant de localités différentes peuvent être retrouvés dans un même ensemble. Cependant une exception est à considérer, pour l'isolat Ptr30 isolé de blé dur et qui se retrouve dans un groupe à part. De même que ce regroupement ne trouve pas d'explication lorsque l'espèce de blé à partir de laquelle les isolats ont été isolés est considérée, puisqu'il est possible de retrouver des isolats provenant de blé dur qui sont réunis avec d'autres isolés de blé tendre. Nous notons également que les isolats provenant de la même lésion ne se retrouvent pas rassemblés au même niveau. C'est le cas notamment des isolats Ptr73, Ptr75 et Ptr76 qui ne sont réunis qu'à un niveau de similarité de 17% (Fig. 44).

L'indice de Jaccard a permis d'évaluer le degré de similarité existant entre chaque paire des différents individus de la population pathogène analysée. Sa valeur a varié entre 1,43% et 68,37% (Annexe 7), ce qui indique une diversité très importante du pathogène. L'isolat Ptr24 qui s'est distingué lors de l'analyse hiérarchique, présente des valeurs d'indice de Jaccard faibles avec les autres individus de la population analysée. Elles sont comprises entre 1,83% de similarité avec l'isolat Ptr30 et 16,43% de similarité avec Ptr2, ce qui confirme la différence de cet isolat par rapport aux autres.

La classification hiérarchique basée sur l'indice de similarité de Jaccard, a été réalisée une seconde fois en considérant uniquement les isolats dont le type de race a été identifié au préalable. Les résultats obtenus et représentés par la figure 46 montrent que l'isolat Ptr24 se différencie fortement du reste des isolats ; il forme à lui seul un groupe séparé qui ne présente qu'environ 8% de similitude avec les autres individus de la population. La valeur du bootstrap de 100% pour le nœud de l'arbre phylogénétique concerné, appuie fortement l'éloignement phylogénique de cet isolat mis en évidence par la classification hiérarchique.

A un niveau de similitude de 36%, il est possible de distinguer 12 groupes différents ; à l'intérieur de ces derniers nous notons que certains isolats appartenant à des races différentes se retrouvent dans un même groupe. Toutefois il est possible de noter à ce niveau de similitude que Ptr75, l'un des deux isolats de la race 6 introduit dans cette étude, se distingue et forme un groupe à part (Ptr26, le second isolat de cette race se distingue par un groupe individualisé à un niveau de moins 45% de similitude). De même que Ptr76 et Ptr68 forment chacun séparément un groupe distinct ; ces deux isolats se sont également caractérisés par le fait qu'ils n'appartiennent à aucune des 8 races connues.

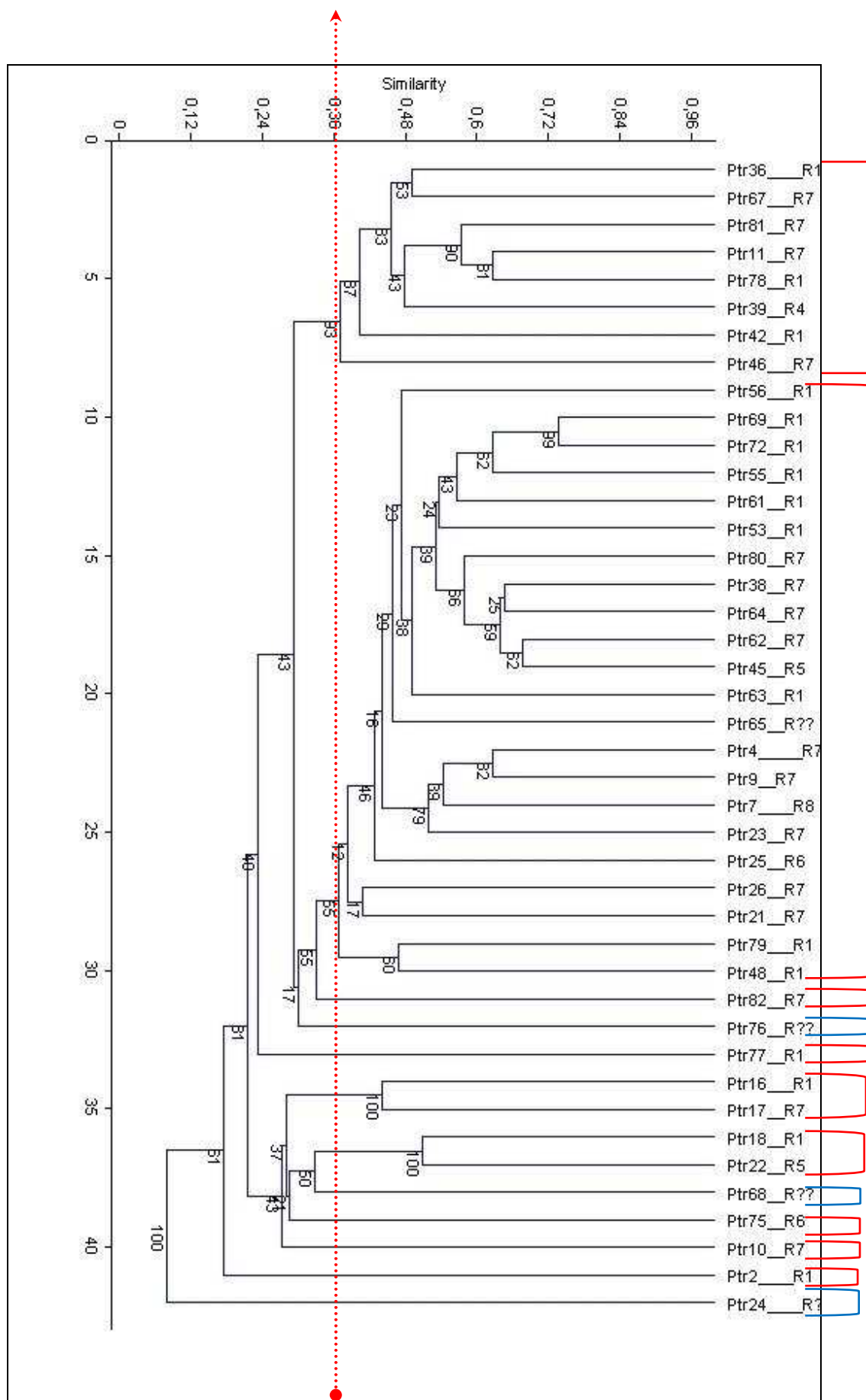


Figure 44 : Dendrogramme généré sur la base des distances de similarité de Jaccard montrant la classification hiérarchique des isolats dont la nature de la race est connue.

Leur profil de virulence nous a permis de proposer l'existence d'une 9^{ème} race. Le dernier isolat de ce groupe d'isolats (Ptr65) se distingue par un ensemble à part à 45% de similitude.

Par ailleurs, nous notons que le seul isolat de la population étudiée appartenant à la race 4, se retrouve isolé seul dans un groupe, à un niveau de similitude de 48% par rapport aux autres ensembles révélés par l'analyse hiérarchique.

Le Test de Bootstrap a généré lors de la classification de l'ensemble des individus de la population, des valeurs comprises entre 5 et 100%, certaines de ces valeurs sont qualifiées de faibles. Toutefois nous avons noté que 52% d'entre elles sont supérieures à 50% ; les nœuds affectés par ces valeurs, traduisent une meilleure robustesse des branches concernées. Lorsque seuls les isolats dont le type de races avait été déterminé, ont été classés, les valeurs de Bootstrap ont varié entre 12 et 100%. Lors de cette dernière analyse 63%, des valeurs étaient supérieures à 50%. Selon Moore and Frazer (2002), une valeur du Bootstrap supérieure à 95% indique une très grande robustesse des branches de l'arbre phylogénique concerné. Des valeurs inférieures à 50% signifient une faible robustesse.

Une variabilité génétique importante a été mise en évidence entre les isolats de *P. tritici-repentis* isolés aussi bien de blé dur que de blé tendre, collectés à travers les différentes régions céréalières du pays. Pour les 61 isolats qui composent la population analysée, les marqueurs AFLP ont révélé la présence de 61 haplotypes différents.

Les combinaisons d'amorces C70 et C11 ont été les plus informatives ; elles ont permis de révéler des *loci* qui présentent en moyenne les valeurs du PIC les plus élevées et de ce fait, ils présentent donc les pouvoirs discriminants les plus forts. Ainsi, pour les analyses futures il serait possible de choisir un nombre plus faible de marqueurs, uniquement ceux qui apportent le plus d'information. Par conséquent, la possibilité de réaliser des analyses plus rapides et moins coûteuses, des populations de ce champignon phytopathogène. Malgré l'absence de bandes monomorphes, il est important de rappeler que la combinaison d'amorce C60 a permis de révéler un *locus* qui correspond à un fragment de 154 pb présent chez 58 isolats, ce qui représente plus de 97% de la population. Elle a révélé également deux *loci* correspondant à 317 pb et 351 pb présents chez 57, isolats soit 95% de la population. Ces trois marqueurs devraient être considérés lors de la mise au point d'amorces spécifiques à l'espèce *P. tritici-repentis*. D'autant plus que l'obtention de ce type d'amorces est très importante dans la mesure où l'espèce étudiée est à l'origine de symptômes pratiquement similaires avec ceux produits par une autre espèce affectant le blé qui est le *Cochliobolus sativus*. Ceci rend très difficile la distinction entre les deux pathogènes uniquement en se basant sur les

symptômes (Luz and Bergston, 1987). L'identification des agents pathogènes par le biais d'empreintes génétiques, peut se révéler être un outil très intéressant dans le diagnostic.

Nos analyses ont mis en évidence une grande variabilité au sein de la population avec des valeurs d'indice de similarité entre chaque paire d'isolats présentant souvent de grand écart. Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de cette situation : le nombre d'échantillons, l'organisme étudié, le flux de gènes entre les populations, l'adaptation à l'environnement ainsi que celle à un nouveau hôte, enfin la pression de sélection. Peever et Milgroom (1994), ont conclu que les pathogènes affectant les espèces cultivées étaient rarement en équilibre, car elles sont sujets à une extensive extinction puis à une recolonisation.

La classification hiérarchique basée sur l'indice de similarité de Jaccard a mis en évidence la présence de plusieurs ensembles à des niveaux de similitude relativement bas. Elle a permis de constater que les isolats appartenant au nouveau profil de virulence pouvaient se distinguer des autres groupes d'isolats avec des pourcentages de similitude inférieure à 50% (un maximum noté de 45%). L'un d'entre eux (Ptr24) s'est clairement distinguer du reste de la population étudiée ; le groupe qu'il forme à lui seul, n'exhibe qu'environ 8% de similitude avec les autres groupes. La caractéristique principale de ces isolats réside dans le fait qu'ils ont tous été isolés à partir de la même espèce à savoir le blé dur. Ils n'ont été capables d'attaquer que les génotypes de blé dur composant la gamme d'hôte différentielle. Cette catégorie d'isolats semble produire une ou plusieurs toxine(s) non identifiée(s) encore ; ceci suppose une ou plusieurs voie(s) métabolique(s) encore inconnue(s) et par conséquent probablement des portions du génome différentes des autres races. La technique AFLP permet d'analyser la diversité sur la totalité du génome de l'espèce étudiée, il est possible que certains marqueurs aient atteint des régions de l'ADN qui seraient différentes chez cette nouvelle race par rapport aux 8 autres races connues jusqu'ici.

De même, Ptr39, le seul isolat de la race 4 est retrouvé formant un groupe à part séparé des autres groupes d'isolats, à un niveau de 48% de similarité. Cette race est considérée non pathogène sur le blé, où plusieurs travaux antérieurs ont montré sa différence sur le plan moléculaire par rapport aux autres races de *P. tritici-repentis*. Lichter et al. (2002) en comparant le caryotype d'isolats virulents et non virulents, ont montré qu'une partie d'un chromosome était complètement absente chez les isolats de la race 4. Cette partie du chromosome comporte le gène ToxB, codant pour la PtrToxB ainsi que quelques séquences répétées semblables à des éléments transposables. De plus, la race 4 est la seule dont le génome abrite le gène *toxb*, ce dernier qui est un

homologue de ToxB , exhibe uniquement 86% de similarité avec ce dernier (Martinez et al. 2004). Selon ces derniers auteurs, cet état de fait rend la régulation de *tox*b différente de celle de ToxB. Dans le cas présent, il est très possible également que les marqueurs AFLP soit capables d'atteindre des endroits du génome qui sont différentes chez les isolats non virulents. Leisova et al. (2008), en utilisant les marqueurs AFLP ont également rapporté la distinction de la race 4 en un groupe séparé des autres et à une distance légèrement plus éloignée que dans notre cas.

Le test de Bloostrap a permis de tester la robustesse de l'arbre phylogénétique généré par l'analyse hiérarchique et par conséquent la fiabilité de ses branches internes. Certaines des valeurs mises en évidence sont faibles, ceci a été également rapporté par Leisova et al. (2008) qui ne rapportent que 39% de leurs valeurs supérieures à 50%.

Par ailleurs, l'analyse AFLP de cette population de pathogène a montré qu'une même lésion causée par le *P. tritici-repentis* pouvait être le résultat d'isolats différents sur le plan génotypique. Nous avons noté non seulement que les haplotypes des isolats au niveau des mêmes lésions étaient différents, mais également que l'analyse hiérarchique, classait ces haplotypes à des niveaux de similitude relativement faibles. Ce qui montre que leur ancêtre commun est ancien dans le cours de l'évolution de cette population.

Nos résultats ont montré que la similitude génétique ne pouvait pas être expliquée par la nature de la race, sauf exception de l'isolat Ptr24 qui possède un nouveau profil de virulence et qui semble appartenir à une nouvelle race. Cette absence de lien est aisément compréhensive, dans la mesure où les marqueurs AFLP révèlent la variation tout au long du génome, alors que la classification des races est basée uniquement sur trois *loci* spécifiques. Par conséquent, nous pouvons conclure que dans presque la quasi majorité des cas, les amorces AFLP utilisées marquent des régions du génome de *P. tritici-repentis* qui sont différentes de celles abritant les gènes codant pour la virulence de cette espèce. De plus, il est à noter que l'absence de corrélation entre ces deux caractères peut également s'expliquer par le fait que l'acquisition des caractères spécifiques à l'évolution du pouvoir pathogène, pourrait être moins rapide que ceux qui sont spécifiques à l'évolution génomique. De même, il est à rappeler que la corrélation entre la virulence et les marqueurs moléculaires est généralement faible dans les populations présentant une reproduction sexuée (Burdon et Roelfs, 1985 ; Schhlder et Bergstrom, 1992), alors que l'espèce fongique étudiée possède cette dernière aptitude.

Dans ce même contexte, nos résultats ont également révélé que la similitude moléculaire ne peut être expliquée par l'origine géographique. Ceci trouve son explication dans la biologie de ce champignon et dans son épidémiologie. Selon De Wolf et *al.* (1998), les conidies de *P. tritici-repentis* sont capables en conditions favorables de se déplacer sur une distance comprise entre 10 et 200 km. Il est également reconnu que cette espèce pathogène est transmise par la semence (Schilder et Bergstrom, 1985). Ces deux particularités, rendent possible le déplacement de l'inoculum sur de longues distances. La dispersion de l'inoculum sur de longues distances en présence de la reproduction sexuée, peuvent contribuer à la création d'une diversité génétique importante qui soit indépendante de l'origine géographique, des individus composant la population analysée, ou encore du type de races auxquels ils appartiennent (Singh et Hughes, 2006).

De même qu'il ne semble ne pas y avoir de corrélation apparente entre la similitude moléculaire et l'espèce hôte (blé dur ou blé tendre). Toutefois dans ce dernier contexte le cas de Ptr24 qui a été isolé de Blé dur et qui n'attaque que les blés dur de la gamme différentielle est toujours à relever, car il s'est toujours distingué des autres isolats.

L'absence de corrélation entre la similitude moléculaire et l'origine géographique d'une part et le type de race d'autre part chez le *P. tritici-repentis* a déjà été rapportée dans des travaux antérieurs. En effet, Friseen et *al.* (2005) en utilisant les marqueurs AFLP pour analyser 97 isolats provenant d'Amérique du Nord, d'Amérique du Sud et d'Europe ont abouti aux mêmes résultats. Ils expliquent que ceci indique que dans la nature, les populations de *P. tritici-repentis* possèdent une tendance préférentielle à la fécondation croisée (Allofécondation = Outcrossing). De même, que ceci indique selon les mêmes auteurs que l'introduction et la propagation de cette population pathogène est ou bien récente ou encore qu'il existe un flux de gènes permanent à travers les différentes régions du monde qui est dû aux échanges de semences. Dans le cas de notre population la seconde explication nous semble plus vraisemblable en raison de la grande diversité pathologique que nous avons relevée dans les champs algériens, et qui indique plutôt une introduction ancienne du pathogène.

Par ailleurs, d'autres auteurs ayant utilisé les marqueurs RAPD sont arrivés aux mêmes résultats, notamment, Singh et Hughes (2006), qui ont analysé la diversité existante dans une population de 33 isolats appartenant uniquement à quatre races différentes (1, 2, 3, 4) et Dos Santos et *al.* qui ont analysé 12 isolats brésiliens provenant de semences de blé. Enfin les marqueurs ISSR utilisés par Moreno et *al.* (2008) sur une

collection de 51 isolats argentins n'ont révélé également aucune corrélation entre les paramètres indiqués.

Cependant, les travaux de Leisova et *al.* (2008) indiquent que la similarité génétique révélée par des marqueurs AFLP au sein de leur population d'étude, peut être expliquée partiellement par la nature de la race, la plante hôte et par l'origine géographique. Chacun des facteurs posséderait un certain impact sur la structure de pathogène. Il est à rappeler enfin que la plupart des travaux réalisés dans ce domaine et ayant comme sujet d'étude plusieurs espèces pathogènes ne révèlent pas l'existence de corrélations.

Enfin, dans un contexte plus général, et afin de comprendre la grande diversité génétique observée, nous rappelons que les champignons possèdent une large stratégie de reproduction, ce qui a un impact évident sur la biologie de leur population. Le facteur le plus important affectant la variabilité pour plusieurs champignons phytopathogène est l'abondance de la reproduction sexuée et asexuée. Ainsi, la reproduction sexuée crée plusieurs nouveaux génotypes et permet aux nouveaux gènes et ceux qui existent déjà de se recombiner à l'intérieur d'un pool génétique. A chaque génération ce dernier devient encore plus différent (Busdon and Roelfs, 1985), ceci décrit parfaitement le *P. tritici-repentis*. En effet celui-ci, est un champignon homothalique qui possède les deux modes de reproduction. Le stade sexué se produit sur la paille entre deux cultures, alors que le stade asexué se répète sur la culture plusieurs fois tout le long de la saison. L'existence de la recombinaison sexuée dans la nature est probablement la raison principale de l'importante variabilité observée chez les isolats.

Il est à rappeler également, que les espèces herbacées spontanées qui sont des hôtes du *P. tritici-repentis*, pourraient représenter une importante source de variabilité génétique chez la population de cette espèce pathogène. Elles peuvent être un grand réservoir de nouveaux biotypes génétiquement différents de ceux prévalents sur le blé (Krupinsky, 1987 ; Ali and Lamari, 1997 ; De wolf et *al.*, 1998). Selon ces mêmes auteurs, en absence de cultures de blé, ces espèces herbacées spontanées, sont le parfait refuge pour le *P. tritici-repentis*, et représentent une source importante d'inoculum primaire.

Enfin d'autres facteurs affectant la variabilité d'un champignon et ne sont pas à exclure, et notamment les mutations où il est admis chez les champignons qu'à chaque génération et en moyenne, une mutation peut se produire pour chaque million de gènes (Agrios, 2005). En considérant que le génome de *P. tritici-repentis* comporte 12171 gènes (Anonyme, 2011), nous pouvons conclure globalement que plus d'une cellule sur

100, pourrait être un mutant. Par conséquent il est possible de supposer qu'il existe plusieurs mutants dans une même colonie fongique. De même que le flux de gènes pourrait être à l'origine de cette diversité. Ceci en raison du fait qu'une population pathogène chez laquelle, le flux de gène est important, possède généralement une plus grande diversité que celle chez qui le flux de gène est faible (Agrios, 2005). Nous devons également considérer une possibilité d'action de la dérivé génétique, de la sélection et de l'hétérokaryotie qui sont aussi des mécanismes à l'origine de la variabilité des champignons (Agrios, 2005).

Conclusion Générale

Et

Perspectives

Le présent travail a permis de faire la lumière sur l'une des maladies fongiques du blé les plus fréquemment rencontrée dans les différentes zones céréalières du pays. Et ceci en apportant de précieuses données relatives à la structure des populations de l'agent causal *P. tritici-repentis*.

Les résultats obtenus, ont montré la présence de la maladie dans 39 localités prospectées au niveau de 15 wilayas du pays. L'importance de la maladie est jugée plus grande sur les régions littorales comparées aux régions sub-littorales. De même qu'elle semble plus présente dans le centre du pays, comparée à l'Est et à l'Ouest. La tache bronzée du blé, concerne aussi bien les cultures de blé dur que celles de blé tendre ; les variétés attaquées par le champignon dans les champs visités ont été les suivantes, Chen's, Hiddab , Anza (Blé tendre) et Vitron, GTA/dur, waha, Bidi 17, Semeto (blé dur). Dans ce contexte il est important de noter que les variétés communément cultivées à savoir, Hidab et Vitron paraissent particulièrement sensibles à ce champignon.

La caractérisation morphologique de plusieurs isolats de l'espèce étudiée a montré l'existence d'une différence très hautement significative entre les isolats étudiés, aussi bien pour la longueur des conidies que pour le nombre de cloisons existantes au niveau de la conidie. Cependant aucune différence n'est notée quant à leur diamètre. En considérant la moyenne de la croissance journalière de l'ensemble des résultats, nous notons que celle-ci atteint son optimum lorsque les colonies sont incubées à 25°C. Toutefois, si dans la plupart des cas nous observons une meilleure croissance à 25°C, plusieurs isolats se sont révélés croître mieux à 30°C et trois isolats ont montré un maximum de croissance à 20°C. L'analyse en composantes principales (ACP) des valeurs de la croissance radiale journalière à différentes températures a permis de séparer les isolats étudiés en 6 groupes distincts.

Par ailleurs, les résultats des inoculations ont mis en évidence différents profils de virulence qui montrent la présence dans les champs de blé de six races différentes 1, 4, 5, 6, 7 et 8, avec une prédominance des races 1 et 7 dont quatre races (1, 4, 7 et 8) qui sont rapportées pour la première fois en Algérie. La répartition spatiale des races sur le territoire national a été réalisée, de même que la prédominance des races sur chacune des deux espèces de blé a été analysée. Par ailleurs, nous avons noté la présence d'un nouveau profil de virulence qui ne correspond à aucune des 8 races connues à ce jour. Ce qui révèle la présence dans les zones céréalières d'une nouvelle race (proposée comme race 9). Les isolats appartenant à cette catégorie ont été tous isolés à partir d'échantillons de blé dur et ne semble attaquer que les génotypes de blé dur de la gamme d'hôte différentielle utilisée. L'inoculation de confirmation des isolats montrant le nouveau

profil de virulence a confirmé ces résultats. En effet, aucune évolution significative des symptômes n'a été observée après 14 jours d'inoculation. Ces résultats ont permis de confirmer les résultats observés précédemment et d'exclure toute possibilité de confusion avec les races 1, 4 ou 5. Par conséquent le profil de virulence noté est nouveau et différent et les isolats appartiennent à une nouvelle race.

Suite aux résultats précédents, nous recommandons que la gamme d'hôte différentielle soit dans le futur composée aussi bien de blé dur que de blé tendre et nous proposons que la gamme d'hôtes à utiliser dans le futur soit la suivante : Glenlea, 6B662, 6B365, Salamouni, Ktepwa, (Blés tendres) Coulter, 4B160, 4B1149 (Blés durs).

La forme parfaite *P. tritici-repentis* a été produite au laboratoire pour deux isolats. Ces derniers ont été choisis parmi le groupe d'isolats présentant le nouveau profil de virulence (nouvelle race). Les valeurs des mesures réalisées sur les fructifications nous ont permis d'établir clairement la corrélation existante entre l'anamorphe *Drechlera tritici-repentis* et le téléomorphe *P. tritici-repentis*. Et par conséquent ils ont confirmé l'appartenance des isolats présentant un nouveau profil de virulence, à l'agent causal du tan spot.

Une caractérisation moléculaire des isolats possédant le nouveau profil de virulence et représentant potentiellement la race 9 de ce pathogène a été entamée. Ainsi, l'inoculation artificielle a mis en évidence une absence de production des trois toxines PtrToxA, PtrToxB et PtrToxC ; ceci nous a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle il y aurait une absence des gènes contrôlant leur production ou l'inhibition de ces gènes. Nous avons donc vérifié la présence des gènes de virulence ToxA et ToxB et analysé leurs séquences respectives. La forme allélique *toxb* qui est un homologue de ToxB existant chez la race 4 qui ne produit aucune toxine a été également recherché. Les gènes recherchés ToxA et ToxB, ont été retrouvés dans le génome des isolats analysés. Par contre, les réactions PCR réalisées n'ont pas révélé la présence de *toxb* chez aucun des isolats présentant le nouveau profil de virulence. La présence des deux gènes ToxA et ToxB malgré l'absence des symptômes habituellement induits par leur produits, laisse supposer l'existence d'homologues pour ces deux gènes non connus encore. La présence d'un homologue de ToxA est une première, fait qu'aucun homologue de ce gène n'est connu à ce jour chez l'espèce *P. tritici-repentis*.

Les séquences obtenues qui ne représentent qu'une partie de la séquence codante pour chacun des deux gènes ne présentent aucune mutation. La synthèse des toxines peut être affectée par les différents facteurs contrôlant la biosynthèse d'une protéine chez les organismes eucaryotes. Ceci ouvre plusieurs voies d'investigations ; en

effet toute une série de possibilités s'enchaîne, depuis une structure particulière de la chromatine (niveau élevé de régulation) jusqu'à une régulation post traductionnelle (dernier stade possible de régulation). Plusieurs hypothèses ont été discutées, afin d'expliquer l'absence d'expression des deux gènes.

L'analyse de la diversité génétique chez *Pyrenophora tritici-repentis* a été effectuée grâce à la technique fAFLP. Cette analyse a concerné 61 isolats de *P. tritici-repentis* provenant de différentes régions céréalière du pays. L'ADN génomique a été digéré par les enzymes de restriction MseI et EcoRI. Sur les 78 couples d'amorce testés, 12 ont été sélectionnés pour cette étude. Ces dernières ont mis en évidence une grande variabilité génétique au sein de la population d'étude ; celle-ci a été exprimée par la présence de 61 haplotypes différents et par les valeurs de l'indice de similarité de Jaccard qui sont dans la plupart des cas faibles.

Les combinaisons d'amorces C70 et C11 ont été les plus informatives ; elles ont permis de révéler des *loci* qui présentent les pouvoirs discriminants les plus forts. Elles sont donc recommandées pour les futurs travaux, ceci permettra un gain de temps et une diminution du coût. La combinaison C60 a permis de révéler un *locus* présent chez plus de 97% de la population. Elle a révélé également deux *loci* présents chez 95% de la population. Ces trois marqueurs devraient être considérés dans le cadre de la mise au point d'amorces spécifiques à l'espèce *P. tritici-repentis*.

La classification hiérarchique basée sur l'indice de similarité de Jaccard a permis de constater que les isolats appartenant au nouveau profil de virulence, pouvaient se distinguer des autres groupes d'isolats à des niveaux de similitude inférieure à 50%. L'un d'entre eux (Ptr24) s'est clairement distingué du reste de la population étudiée avec uniquement 8% de similitude ; sa position a été fortement confirmée par le test de Bootstrap qui a généré suite à 1000 répliques, une valeur de 100%.

L'importante diversité génétique relevée dans la population est également exprimée au niveau de la lésion. En effet les isolats provenant d'une même lésion se sont révélés génétiquement distincts et exhibent des haplotypes différents.

Enfin le présent travail, a montré l'absence de corrélations entre la similarité moléculaire et le type de race, l'origine géographique ou l'espèce hôte.

L'importante variabilité pathologique et génétique notée chez le *P. tritici-repentis*, agent causal du tan spot, représente un facteur supplémentaire pour justifier l'urgence de la prise en charge de ce problème phytosanitaire dans nos champs de blé. Ceci est

d'autant plus vrai, qu'une espèce présentant une large variabilité possède de grands potentiels d'évolution et par voie de conséquence, elle est capable de contourner toute forme de résistance. De même qu'elle possède une plus grande capacité à développer des résistances aux fongicides.

A la lumière de ces résultats, plusieurs perspectives sont envisageables ; il nous semble intéressant de poursuivre les investigations relatives au nouveau profil de virulence découvert et qui nous a permis de proposer l'existence d'une 9ème race. Dans ce contexte deux aspects devront être mis à l'étude. Le premier est la poursuite de la caractérisation moléculaire des isolats en question en accentuant l'intérêt sur l'isolat Ptr24. Le second est l'identification et la purification de la (des) toxine(s) responsable(s) de la virulence chez ces isolats.

Par ailleurs, il est indispensable également de cerner la capacité d'évolution de ce champignon dans les champs de blé à travers le territoire national. Ceci sera possible grâce à des surveillances annuelles de l'incidence et de la sévérité de la maladie, ainsi que de la distribution des différentes races et de leur importance d'une saison à une autre. Cette démarche permettra de développer des formes de résistance stables et des stratégies de lutte durables qui permettent de minimiser la pression de sélection dans les populations pathogènes du *P. tritici-repetis* présentes dans nos champs.

Dans une perspective d'utilisation de génotypes résistants, nous recommandons la sélection pour des gènes majeurs. Un screening des variétés existantes dans le catalogue national et autorisées à la multiplication, est souhaité. Dans ce même contexte il serait très judicieux de rechercher des sources de résistance également dans les variétés locales. En effet ignorant encore la période exacte d'apparition de ce champignon dans nos champs, il n'est pas à exclure que son introduction ait accompagné l'introduction de variétés qualifiées à meilleur rendement.

Une meilleure connaissance des populations de ce pathogène suppose également sa connaissance au niveau des autres espèces hôtes autres que les céréales. Ces dernières espèces présentent un grand réservoir d'inoculum primaire et une source de variabilité, à ne pas négliger. Ceci suppose également la nécessité de répertorier les autres espèces hôte qui sont souvent des espèces spontanées qualifiées d'adventices et qui peuvent être retrouvées dans nos champs. Cette démarche permettra d'éradiquer une source d'inoculum primaire importante.

En attente d'une telle approche globale multidisciplinaire, impliquant des phytopathologistes, des biologistes moléculaires, des biochimistes, des améliorateurs et

des écologistes, la rotation, l'élimination des débris de culture et les traitements chimiques d'appoint restent trois actions importantes à mener.

.

Références Bibliographiques

1. Abd-Elsalam K.A., Khalili M.S., Aly A.A. and Asran-Amal A., 2002. Genetic diversity among *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* isolates revealed by UP-PCR and AFLP markers. *Phytopathologia Mediterranea*. 41: 1-7.
2. Adee E.A. and Pfender W.F. 1989. The effect of primary inoculum level of *Pyrenophora tritici-repentis* on tan spot epidemic development of wheat. *Phytopathology*. 80: 1228-1232.
3. Agrios G. 2005. *Plant Pathology*. Ed. Elsevier Academic Press. 922p.
4. Ainsworth G.C., Sparrow F.K. and Sussman A.S. 1973. The fungi IVA. A taxonomic review with keys. Academic press, New York, 621p.
5. Alam K.B. and Gustafson J.P. 1988. Tan-spot resistance screening of *Aegilops* species. *Plant Breeding*. 100: 112-118.
6. Alfenas A.C., Jeng R. and Hubbes M. 1984. Isozyme and proteins of isolates of *Cryphonectria cubensis* differing in virulence. *Canadian Journal of Botanic*. 62: 23-30.
7. Ali S., Gurung S. and Adhikari T.B. 2010. Identification and Characterization of Novel Isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from Arkansas. *Plant Disease*. 94(2):229-235.
8. Ali S., Singh P.K., McMullen M.P., Mergoum M. and Adhikari T.B. 2007. Resistance to multiple leaf spot diseases in wheat. *Euphytica*: 67: 34-75.
9. Ali S., Adhikari T., Barbara S. and Cole H. 2006. *Pyrenophora tritici-repentis* (Tan spot) races in Australia. In: 2006 APS Annual Meeting, Abstracts of Presentations. Quebec City, July 29- August 2. *Phytopathology*. 96(6): S4.
10. Ali S. and Franc L.J. 2002. A new race of *Pyrenophora tritici-repentis* from Brazil. *Plant disease*. 86: 1050.
11. Ali S. and Ling H., Meinhardt S et Franc L.J. 2002. A new race of *Pyrenophora tritici-repentis* that produces a putative host selective toxin. *Phytopathology*. 92:S3.
12. Ali S., Franc L.J. and De Wolf E.D. 1999. First report of *Pyrenophora tritici-repentis* race 5 from North America. *Plant disease*. 83: 591.
13. Ali S. and Lamari L. 1997. Characterization of physiological variation in *Pyrenophora tritici-repentis* population from native grasses of Manitoba. Third International Tan Spot Workshop (Abstract), July 10-11, Winnipeg, Canada, 8p.p.
14. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*. 215: 403-410.
15. Amaike S., Ozga J.A., Basu U, and Strelkov S.E. 2008. Quantification of *ToxB* gene expression and formation of appressoria by isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* differing in pathogenicity. *Plant Pathology*. 57: 623-633.

16. Anderson J.A., Effertz R.J., Faris J.D., Franc L.J., Meinhardt S.W. and Gil B.S. 1999. Genetic analysis of sensitivity to a *Pyrenophora tritici-repentis* necrosis inducing toxin in durum and common wheat. *Phytopathology*. 89: 293-297.
17. Andrie R.M., Schoch C.L., Hedges R., Sptafora J.W. et Ciuffetti L.M. 2008. Homologs of *ToxB* a host selective toxin gene from *Pyrenophora tritici-repentis*, are present in genome of sister species *Pyrenophora bromi* and other members of *Ascomycota*. *Fungal Genetic and Biology*. 45: 365-377.
18. Andrie R.M., Pandelova I., and Ciuffetti L.M. 2007. A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification. *Phytopathology*. 97: 694–701.
19. Anonyme 2011b. *Pyrenophora tritici-repentis* Database: Genome and Assembly Statistics.
(http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/pyrenophora_tritici_repentis.3/SingleGenomeIndex.html).
20. Anonyme. 2003. *ICARDA annual report .Theme 2: Production systems management*. Online : <http://www.icarda.org/Publication/AnnualReport/2003/Project2-1.htm>.
21. Asad S., Iftikhar S., Munir A. and AHMAD I. 2009. Characterization of *Bipolaris Sorokiniana* isolated from different agro-ecological zones of wheat production in *Pakistan Journal of Botanict*. 41(1): 301-308.
22. Aung T.S.T.2001. Molecular polymorphism and virulence of *Pyrenophora tritici-repentis*. Master of Science thesis, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, 82p.
23. Bach E.E, Barros B.C. and Kimatt H. 2003. Induced Resistance against *Bipolaris bicolor*, *Bipolaris sorokiniana* and *Drechslera tritici-repentis* in wheat Leaves by Xanthan Gum and Heat-Inactivated Conidial Suspension. *Journal of Phytopathology*. 151: 411-418.
24. Ballance G.M., Lamari L., Kowatsch C.C. and Bernier C.C. 1996. Cloning, expression and occurrence of the gene encoding the Ptr necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant Pathology*. Online: <http://www.bspp.org.uk/mppol/1996/1209ballance/>.
25. Balance G.M., Lamari L. and Bernier C.C. 1989. Purification and characterization of a host-selective necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 35: 203-213.
26. Barry C., Faugeron, G. and Rossignol, J. L. 1993. Methylation induced premeiotically in *Ascobolus*: Coextension with DNA repeat lengths and effect on

transcript elongation. Proceeding of National Academy of Sciences of the United State of America. 90: 4557–4561.

27. Bayraktar H, Dolar F.S and Tör M. 2007. Determination of genetic diversity within *Ascochyta rabei* (Pass.)Labr., The case of Ascochyta Blight of chickpea in Turkey. *Journal of Plant Pathology*. 89 (3): 341-347.
28. Belabid L. 2002. La Fusariose vasculaire de la lentille (*Lens culinaris* Med.) dans le nord-ouest algérien : Morphologie et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Emend. S. & H. f. sp. *lentis* (Vasud. & Srin.) en relation avec la repartition géographique et le pouvoir pathogène. Thèse de doctorat, Université d'Oran, Oran, 178 p.
29. Bendif N., 1994. La situation actuelle des maladies des céréales en Algérie. Résultats d'enquête. *Céréiculture*. 27 : 8-12.
30. Benslimane H. 2002. Caractérisation de quelques isolats de *Pyrenophora graminea* S. Ito & Kuribay et leur comportement à l'égard de cinq génotypes d'orge. Mémoire de Magister, Institut National Agronomique, El-Harrach, Alger, 82p.
31. Bernier, Jeng L.R.S. and Hubbes M. 1983. Differentiation of aggressive and non-aggressive isolates of *Ceratocystis ulmi* by electrophoresis of intramycelial enzymes. *Mycotaxon*. 17: 466-472.
32. Bockus W.W.1998. Control strategies for stubble-borne pathogens of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20: 371-375.
33. Bockus W.W. and Davis M.A. 1993. Effect of nitrogen fertilizers on severity of tan spot of winter wheat. *Plant Disease*. 77: 508-510.
34. Borchardt D.S., Welz H.G. and Geiger H.H.1998. Genetic structure of *Setosphaeria turcica* populations in tropical and temperate climates. *Phytopathology*. 88: 322-329.
35. Botstein D, White RL, Skolnick M and Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.
36. Bouras N. and Strelkov S.E. 2008. The anthraquinone catenatin is phytotoxic and produced in leaves and kernels of wheat infection by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 72: 87-95.
37. Burdon J.J. and Roelfs A.P. 1985. The effect of sexual and asexual reproduction on the isozymes structure of population of *Puccinia graminis*. *Phytopathology* 75: 1068-1073.

38. Burdon J.J. and Marshall D.R. 1981. Isozyme variation between species and formae speciales of the genus *Puccinia*. *Canadian Journal of Botanic*. 59: 2628-2643.
39. Champion R. 1997. Identifier les champignons transmis par les semences. ed. I.N.R.A., France, 398 p.
40. Chand R., Singh H.V., Joshi A.K. and Duveiller E. 2002. Physiological and morphological aspects of *Bipolaris sorokiniana* surviving on wheat straw. *Plant Pathology Journal*. 18(6): 328-332.
41. Ciuffetti L.M. and Tuori R.P. 1999. Advances in the characterization of the *Pyrenophora tritici-repentis*-wheat interaction. *Phytopathology*. 89: 444-449.
42. Ciuffetti L.M., Tuori R.P. and Gavena J.M. 1997. A single gene encodes a selective toxin causal to the development of tan spot of wheat. *Plant cell*. 9: 135-144.
43. Chen X, Line R.F. and Leung H. 1993. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. *Phytopathology*. 83 : 1489-1497.
44. Chu C.G., Friesen T.L. and Faris J.D. 2008. Identification of novel tan spot resistance loci beyond the known host-selective toxin intensively genes in wheat . *Theoretical and Applied Genetics*. 117: 873-881.
45. Colson E.S., Platz G.J. and Usher T.R. 2003. Fungicidal control of *Pyrenophora tritici-repentis* in wheat. *Australasian Plant Pathology*. 32: 241-246.
46. Christensen J. J. and Graham T. W. Physiologic specialisation and variation in *Helminthosporium gramineum* Rab. *Technical bulletin* 95 : 3-40.
47. Crossa J., Burgeno J., Dreisigacker S., Vargas M., Herrera-Foessel S.A., Lillemo M. and Singh R.P. 2007. Association analysis of historical bread whet germplasm using additive covariance of relative and population structure. *Genetics*. 177: 1889-1913.
48. De Wolf E. 2008. Black point in Wheat : Is a seed treatment needed ? . K. *Stat Agronomy extension e-Updates*. n. 155. Ed. K. Stat Extension Agronomy and Steve Watson, 5p.
49. De Wolf E., Effertz R.J., S. Ali and Franci L.J. 1998. Vista of tan spot research. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20: 349- 444.
50. Djermoun A., 2009. La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques. *Revue Nature et Technologie*. 01 : 45-53.
51. Dos Santos A.M.P.V., Matsumura A.T.S. and Vander Sand S.T. 2002. Intraspecific genetic diversity of *Drechslera tritici-repentis* as detected by random amplified polymorphic DNA analysis. *Genetics and Molecular Biology* **25**: 243-250.

52. Diekmann M. and C.A.J. Putter (ed.). 1995. Small Grain Temperate Cereals. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm no. 14. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 66 p.
53. Dushnicky L.G. 1993 . A microscopy study of the infection process of *Pyrenophora tritici-repentis* in susceptible and resistant wheat cultivars. Master of Science Thesis, University of Manitoba, Winnipeg, Canada, 201p.
54. Dushnicky L.G., Balance G.M., Sumner M.L. and MacGregor A.W. 1998. The role of lignification as resistance mechanism in wheat to toxin-producing isolate of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20:35-47.
55. Dushnicky L.G., Balance G.M., Sumner M.L. and MacGregor A.W. 1996. Penetration and infection of susceptible and resistant wheat cultivars by necrosis toxin-producing isolate of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 18: 392-402.
56. Duveiller E. 2004. Controlling Foliar Blights of wheat in the Rice-Wheat Systems of Asia. *Plant Disease*. 88: 552- 556.
57. Dutech C., Enjalbert J., Fournier E., Delmotte F., Barrès B., Carlier J., Tharreau D. and Giraud T. 2007. Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 44: 933–949.
58. Duveiller E., Singh R.P. and Nicol J.M. 2007. The Challenges of maintaining wheat productivity: pests, diseases , and potential epidemics . *Euphytica*. 157: 417- 430.
59. Drechsler C. 1923. Some graminicolous species of *Helminthosporium*. *Journal of Agricultural Research*. 24: 641-740.
60. Effertz R.J., Meinhardt S.W., Anderson J.A., Jordahl J.G. and Franci L.J. 2002. Identification of a chlorosis-inducing toxin from *Pyrenophora tritici-repentis* in adult and seedling wheat. *Phytopathology*. 91: 572-533.
61. Elias E., Cantrell R.G., Horsford R.M. 1989. Heritability of resistance to tan spot in durum wheat and its association with other agronomic traits. *Crop Science*. 29: 299-304.
62. Ellingboe A.H. 1976. Genetics of host-parasite interactions. In: *Encyclopedia of plant physiology*. Vol.4 . *Physiological plant pathology*. Ed. R. Heitefuss and P.H. Williams; Springer Verlag , New York, p.p.761-778.
63. Ellis MB, 1976. Dematiaceous hyphomycetes. Wallingford, Oxon, UK: CAB International
64. Engle J.S., Lipps P.E. and Millis D. 2004. Tan Spot:Yellow Leaf Spot or Blotch. Ed. The Ohio State University, 2p.

65. Faris J.D. and Friesen T.L., 2005. Identification of quantitative loci for race nonspecific resistance to tan spot in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 111: 386-392.
66. Faris, J. D., Anderson, J. A., Francl, L. J., and Jordahl, J. G. 1996. Chromosomal location of a gene conditioning insensitivity in wheat to a necrosis-inducing culture filtrate from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology* 86:459-463.
67. Fernandez M.R, DePauw R.M. and Clarke J.M. 2001. Reaction of common and durum wheat cultivars to infection of kernels by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 23: 158-162.
68. Fernandez M.R., DePauw R.M., Clarke J.M. and Fox S.L. 1998. Discoloration of wheat kernels by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20: 408-414.
69. Fernandez M.R., DePauw R.M., Clarke J.M. and Lefkovitch L.P. 1996. Read Smudge in durum wheat reduces seedling vigor. *Canadian Journal of Plant Science*. 76: 321-324.
70. Fernandez M.R, Clarke J.M. and DePauw R.M. 1994a. Response of durum wheat kernels and leaves at different growth stages to *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Diseases*. 78: 595-600.
71. Fernandez M.R, Clarke J.M., DePauw R.M., Irvine R.B. and Knox R.E. 1994b. Black point and red smudge in irrigated durum wheat in Southern Saskatchewan in 1990-1992. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 16: 221-227.
72. Field, D., Eggert, L., Metzgar, D., Rose, R., and Wills, C. 1996. Use of polymorphic short and clustered coding region microsatellites to distinguish strains of *Candida albicans*. *FEMS Immunology Medical Microbiology*. 15 : 73-79.
73. Flemming E. 2005. Thaumatin-like protein in transgenic wheat with tan spot resistance. In: More Changes than Wheat .p.p.5-9. International Maize and Wheat Improvement Center, Mexico city, Mexico.
74. Flor H.H. 1959. Host-parasite interactions in flax rust –its genetics and other implications. *Phytopathology*. 45: 680-685.
75. Fofana A., Louanchi M., Robin P., Balesdent M.H and Despreaux D. 1992. Interspecific variation in soluble protein and isozyme patterns in *Rigidoporus lignosus*, the causal agent of white root disease on *Heavea brasiliensis*. *Indian Journal of Natural Rubber Research*. 5: 141-150.
76. Francl L.J. 1997. Local and mesodistance dispersal of *Pyrenophora tritici-repentis* conidia. *Canadian Journal of Plant Pathology* .19: 247-255.

77. Franc L.J. and Jordahl J.G. 1992. Seed Symptomology in durum wheat. In: Advances in Tan Spot Research. p.p. 61-64. Ed. Franc J.M., Krupinsky J.M. and McMullen M.P. North Dakota Agric. Exp. Station, Fargo.
78. Frazzon A.P.G., Matsumura A.T.S. and Van Der Sand S.T. 2002. Morphological characterisation and genetic analysis of *Drechslera teres* isolates. *Genetic and Molecular Biology*. 25(2): 235-241.
79. Friesen T.L and Faris J.D. 2004. Molecular mapping of resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* race 5 and sensitivity to Ptr ToxB in wheat .*Theoretical and Applied Genetics*. 109: 464-471.
80. Friesen T.L., Stukenbrock E.H., Liu Z., Meinhardt S., Ling H., Faris .J.D., Rasmussen J.B., Solomon P.S., McDonald B.A. et Olivier R.P. 2006. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nature Genetics*. 38: 953-956.
81. Friesen T.L., Ali S., Klein K.K. and Rasmussen J.B., 2005. Population genetic analysis of a global collection of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat. *Phytopathology*. **95**: 1144-1150.
82. Friesen T.L., Ali S., Kinan S., Franc L.J. and Rasmussen J.B. 2003. Role of host sensitivity to Ptr ToxA in development of tan spot of wheat .*Phytopathology*. 93: 397-401.
83. Friesen T. L., Ali S., Kianian S., Franc L. J., and Rasmussen J. B. 2002. Role of host sensitivity to Ptr ToxA in development of Tan Spot of wheat. *Phytopathology*. 93: 397-401.
84. Frisvad J.C., Bridge P.D., Arora D.K. 1998. Chemical fungal taxonomy. New York: Marcel Dekker, 87p.
85. Gamba F.M. and Lamari L. 1998. Mendelian inheritance of resistance to tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) in selected genotypes of durum wheat (*Triticum turgidum*). *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20: 408-414.
86. Gamba F.M., Lamari L. and Br  -Baabel A.L. 1998. inheritance of race-specific necrotic and chlorotic reactions induced by *Pyrenophora tritici-repentis* in hexploid wheats. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20: 401-407.
87. Gaur A., Dev U. And Mitter V. 2006. Pathological and Taxonomical Aspects of the Genus *Drechslera*. p.p. 49-78. In: Current concepts in Botany. ed. K.G. Mukerji and C. Manoharachary New Delhi.
88. Gonzalez M., Rodriguez R., Zavala M.E., Jacobo J.L., Hernadez F., Acosta J., Martinez O. and Simpson J. 1998. Characterization of Mexican isolates of

- Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology* 88: 292-299.
89. Goodwin P.H. and Annis S.L. 1991. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. *Applied and Environmental Microbiology* . 57: 2482-2486.
 90. Guo L.D. 2010. Molecular diversity and Identification of endophytic fungi. In: *Molecular identification of fungi*. p.p. 277-296. ed. Springer Heidelberg Dordrecht, London, 510p.
 91. Gurung S., Bonman J.M., Ali S., Patel J., Myrfield M., Mergoum M., Singh P.K. and Adhikari T.B. 2009 . New and diverse sources of multiple disease Resistance in Wheat. *Crop Science*. 49: 1655- 1666.
 92. Hallock Y. F., Lu H.S.M., Clardy J., Storobel G.A., Sugawara F., Samsodin R. and Yoshida S. 1993. Triticones, spirocyclic lactams from the fungal plant pathogen *Drechslera tritici-repentis*. *Journal of Natural Products*. 56: 747-754.
 93. Hamelin R.C., Dusabenyagasani M. and Et-touil K. 1998. Fine-level genetic structure of white pine blister rust populations. *Phytopathology*. 88: 1187-1191.
 94. Hunger R.M. and Brown D.A. 1987. Colony color, growth, sporulation, fungicide sensitivity, and Pathogenicity of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Disease*. 71(10): 907-910.
 95. Harlan J.R.1987. Center of origin. In: CRC Handboock of plant science in Agriculture Pages 15-21.Vol 1. B.R. Christie.ed. CRC press, Boca Rton.F.L.
 96. Harrington T.C. and Rizzo D.M.1999. Defining species in the fungi. p.p.43-71. In: *Structure and Dynamics of Fungal Populations*. ed. Kluwer Press. Dordrecht.
 97. Hausner G., Hopkin A.A., Davis C.N. and Reid J. 1999. Variation in culture and rDNA isolates of *Sphaeropsis sapinea* from Ontario and Manitoba. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 21: 256-264.
 98. Hershman D.E. and Vincelli P. 1997. *Kentucky Plant Disease Management Guide for Small Grains*. Ed. University of Kentucky, USA, 6p.
 99. Hosford Jr. R. M. 1972. Propagules of *Pyrenophora trichostoma*. *Phytopathology* . 62. 627-629.
 100. Hosford Jr., R.M. 1971. A form of *Pyrenophora trichostoma* pathogenic to wheat and other grasses. *Phytopathology* 61:28-32.
 101. Ward J.H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association* 58 (301): 236-244

102. Howard R.J. and Morrall R.A.A. 1975. The epidemiology of leaf spot disease in a native prairie: The progression of disease with time . *Canadian journal of Botany*. 53: 1040-1050.
103. Huang, X. and Madan, A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*. 9: 868-877
104. Huber D.M., Lee T.S., Ross M.A. and Abney T.S. 1987. Amelioration of tan spot-infected wheat with nitrogen. *Plant Disease*. 71: 49-50.
105. Hunger R.M. 1987. Colony color, growth, fungicide sensitivity , and pathogenicity of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Disease*. 71(10): 907-910.
106. Istifadah N., Saleeba J.A., and McGee P.A. 2006. Isolates of endophytic *chaetomium spp.* inhibit the fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Botany*. 84: 11486-1155.
107. Jørgensen L.N. and Olsen L.V. 2007. Control of tan spot (*Drechslera tritici-repentis*) using cultivar resistance, tillage methods and fungicides. *Crop protection*. 26: 1606-1616.
108. Kelly A., Alcalá-Jiménez A.R., Baingridge B.W., Heale J.B., Pérez-Artes E. and Jiménez-Díaz R.M. 1994. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* infecting chickpea. *Phytopathology*. 84: 1293-1298.
109. Kema G.H.J., Goodwin S.B., Hamza S., Verstappen E.C.P., Cavaletto J.R., Van der Lee T.A.J., De Weerd M., Bonants P.J.M. and Wlwijk C. 2002. A combined amplified fragment length polymorphism and randomly amplified polymorphism DNA genetic linkage map of *Mycosphaerella graminicola*, in *Septoria tritici* leaf blotch pathogen of wheat. *Genetics*. 161: 1497-1505.
110. Kempken, F., and Küster, U. 1996. *restless*, an active Ac-like transposon from the fungus *Tolypocladium inflatum*: Structure, expression, and alternative RNA splicing. *Molecular and Cellular Biology*. 16: 6563–6572.
111. Kolmer J.A., Liu J.Q. and Sites M. 1995. Virulence and molecular polymorphism in *Puccinia recondita f. sp. tritici* in Canada. *Phytopathology*. 85: 276-285.
112. Kouani A., S. El Jamali et M. Talbi . 2007. Analyse en composantes principales : Une méthode factorielle pour traiter les données didactiques. 2 :1-18.
113. Krupinsky J.M. 1992. Grass hosts of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant disease* .76: 92-95.
114. Krupinsky J.M. 1987. Pathogenicity on wheat of *Pyrenophora tritici-repentis* isolated from *Bromus inermis*. *Phytopathology*. 77: 760-765.

115. Krupinsky J.M. 1982. Observation of host range of isolates of *Pyrenophora trichostoma*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 4:42-46.
116. Krupinsky J.M. and Tanaka D.L. 2001. Leaf spot diseases on winter wheat influenced by nitrogen, tillage, and haying after a grass-Alfalfa mixture in the conservation reserve program. *Plant Disease*. 85: 785-789.
117. Kwon C.Y., Rasmussen J.B., Meinhardt S.W.1998. Activity of Ptr ToxA from *Pyrenophora tritici-repentis* requires host metabolism. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 11: 49-56.
118. Lamari L. 2000. Integrated management of leaf spot disease in wheat. Project results. Manitoba Agriculture, Food and Rural Initiatives.
119. Lamari L. and Strelkov S.E. 2010. The wheat /*Pyrenophora tritici-repentis* interaction :progress towards an understanding of tan spot disease. *Canadian Journal of Plant Pathology*.32: 4-10.
120. Lamari L., Strelkov S.E., Yahiaoui A., Amedov M., Saidov M., Djunusova M. and Koichibaev M. 2005. Virulence of *Pyrenophora tritici-repentis* in the countries of the Silk Road. *Canadian Journal of Plant Pathology*.27: 383-388.
121. Lamari L., Strelkov S.E., Yahiaoui A., Orabi J. and Smith R.B. 2003. The identification of two new races of *Pyrenophora tritici-repentis* from the host centre of diversity confirms a one-to-one relationship in tan spot of wheat. *Phytopathology* 93: 391-396.
122. Lamari L. and Bernier C.C.1991. Genetics of tan necrosis and extensive chlorosis in tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology*.81: 1092- 1095.
123. Lamari L. and Bernier C.C. 1989a. Evaluation of wheat lines and cultivars to tan spot [*Pyrenophora tritici-repentis*] based on lesion type. *Canadian Journal of Plant Pathology*.11: 49-56.
124. Lamari L. and Bernier C.C. 1989b. Toxin of *Pyrenophora tritici-repentis* : host specificity, significance in disease and inheritance of host reaction. *Phytopathology*.79:740-744.
125. Lamari L. and Bernier C.C. 1989c. Virulence of isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* on 11 wheat cultivars and cytology of differential host reaction. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 11: 284-290.
126. Lamari L., Sayoud R., Boulif M. and Bernier C.C.1995. Identification of a new race In *Pyrenophora tritici-repentis*: implication for the current pathotype classification system. *Journal of Plant Pathology* 17:312-318.

127. Lamari L and Bernier C.C. 2004. Temperature-induced resistance to tan spot [*Pyrenophora tritici-repentis*] of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 16: 279-286.
128. Lamari L., Bernier C.C. and Balance G.M.1992. The necrosis- chlorosis model in tan spot of wheat . In: Advances in Tan Spot Research . p.p.10-15.eds. Francl L.J, Krupenski J.M. and Mc Mullen M.P. Proceedings of 2nd International Tan Spot Workshop, North Dakota Agricultural Experiment Station , Fargo, USA.
129. Lamari L. Gilbert J. and Tekauz A. 1998. Race differentiation in *Pyrenophora tritici-repentis* and survey of physiological variation in Western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20: 312-317.
130. Larez C.R., Hosford J.R. and Freeman T.P. 1986 . Infection of wheat and oats by *Pyrenophora tritici-repentis* and initial characterization of resistance. *Phytopathology* 76: 931-938.
131. Laumont, P. et Erroux, J. 1961. Inventaire des blés durs rencontrés et cultivés en Algérie. *Mémoires de la Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord*, 5 : 96.
132. Legendre P. and Legendre L. 1998. Numerical ecology. Second English edition. Elsevier Science, Amsterdam, 853p.
133. Leisová L., Hanzalová A. and Kucera L. 2008. Genetic diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates as revealed by AFLP analysis. *Journal of Plant Pathology*. 90:233-245
134. Lichter A., Gaventa J.M. and Ciuffetti L.M. 2002. Chromosome based molecular characterization of pathogenic and non-pathogenic wheat isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Fungal Genetics and Biology*.37: 180-189.
135. Lin D., Dumas M.T. and Hubbes M. 1989. Isozyme and general protein patterns of *Armillaria spp.* Collected from the boreal mixed wood forest of Ontario. *Canadian Journal of Botanic*.67: 1143-1147.
136. Liu K. and Muse S.V. 2005. Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics*. 21(9): 2128-2129.
137. Loughman R. and Deverall B.J.1986 . Infection of resistant and susceptible cultivars of wheat by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Pathology*. 35: 443-450.
138. Lourd M. 1995. Diversité génétique des populations de parasites des plantes : structures des populations et analyse de la diversité. p.p. 172-186. In : *Modélisation en protection des cultures*. ed. SAVARY SERGE, Paris.
139. Luckow, M. 1995. Species concepts: Assumptions, methods, and applications, *Systematic Bot.* , 20, 589-605.

140. Luz W.C. and Bergstrom G.C. 1987. Interactions between *Cochliobolus sativus* and *Pyrenophora tritici-repentis* on wheat leaves. *Phytopathology*. 77: 1355-1360.
141. Luz W.C. and Bergstrom G.C. 1986. Effect of temperature on tan spot development in spring wheat cultivars differing in resistance. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 8: 451-454.
142. Luz W.C. and Hosford J.R. 1980. Twelve *Pyrenophora tricotoma* races for virulence to wheat in central plains of North America. *Phytopathology*. 70: 1193-1196.
143. Luz W.C., Bergstrom G.C. and Stockwell C.A. 1998. Seed applied bioprotectants for control of seedborne *Pyrenophora tritici-repentis* and agronomic enhancement of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20: 384-386.
144. MacKenzie D.A., Jeenes D.J., Belshaw N.J. and Archer D.B. 1993. Regulation of secreted protein production by filamentous fungi: recent developments and perspectives. *Journal of General Microbiology*. 139 : 2295-2307.
145. Majer D., Mitten R., Lewis B.G., Vos P. And Olivier R.P. 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycological Research*. 100: 1107-1111.
146. McDonald B.A., 2004. Population Genetics of Plant Pathogens. Apsnet Education Center Advanced Topics .
<http://www.apsnet.org/education/AdvancedPlantPath/Topics/popgenetics/>
147. McDonald, B.A., McDermott, J.M., Goodwin, S.B. and Allard, R.W. 1989. The population biology of host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 27: 77-94.
148. McDonald W.C. 1967. Variability and inheritance of morphological mutants in *Pyrenophora teres*. *Phytopathology* 57:747-755.
149. McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J., Moris C., Somers D.J., Appels R. et Devos K.M. 2008. *Catalogue of gene symbols for wheat*. In: Proceeding of 11th International wheat genetics symposium. Ed. Appels R., Eastwood R., Lagudah E., Langridge P., Mackay M. McIntyre L., Sharp P., Brisbane, Austlia.
150. McMullen M. 2003. Tan spot and Septoria /Stagonospora diseases of Wheat: Causal organisms, symptoms, survival and Spread , Management. Ed. North Dakota State University, 8p.
151. McMullen, M.P. and Hosford, D.R. 1989. *Tan spot of wheat*. Ed. North Dakota State University, extension service PP-766. Fargo, ND, USA. 3 p.

152. Manning V.A., Chu A.L., Scofield S.R. and Ciuffetti L.M. 2010. Intracellular expression of a host-selective toxin, ToxA, in diverse plants phenocopies silencing of a ToxA-interacting protein, ToxABP1. *New Phytologist*.
153. Manning V.A., Chu A.L., Steeves J.E., Wolpert T.J. and Ciuffetti L.M. 2009. Host selective toxin of *Pyrenophora tritici-repentis*, Ptr ToxA induces photosystem changes and active oxygen species accumulation in sensitive wheat. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 22: 665-676.
154. Manning V.A., Hardison L.K. and Ciuffetti L.M. 2007. Ptr ToxA interacts with a chloroplast-localized protein. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 20: 168-177.
155. Manning V.A. and Ciuffetti L.M. 2005. Localization of Ptr ToxA produced by *Pyrenophora tritici-repentis* reveals protein import into wheat mesophyll cells. *Plant cell*. 17: 3203-3212.
156. Manning V.A., Pandelova I. and Ciuffetti L.M. 2002. Race for a novel selective toxin. *Phytopathology*. 92, S51 [Abstr.]
157. Maraite H. 1997. Evolution of the nomenclature used for *Helminthosporium* spp. Causing leaf blight of wheat. In: *Helminthosporium* blight of wheat : spot blotch and tan spot p.p.6-9. Proceedings of an International Workshop Held at CIMMYT, El Batan, Mexico.
158. Maraite H., Berny J.F., Goffin A. 1992. Epidemiology of tan spot. In : Advance in tan spot research. Proceeding of 2nd international tan spot workshop. Ed. Franc L.J., Krupinsky J.M. McMullen M.P., North Dakota State University, Fargo.
159. Martinez J.P., Oesch N.V. and Ciuffetti L.M. 2004. Characterization of the multiple-copy host-selective toxin gene, *ToxB* in Pathogenic and non-pathogenic isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 17: 467-474.
160. Martinez J.P., Ottum S.A., Ali S., Franc L.J. and Ciuffetti L.M. 2001. Characterization of the *ToxB* gene from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 14: 675-677.
161. Marshall D. 2009. Disease which challenge global wheat production powdery mildew and leaf and Head Blight. In: Wheat Science and Trade, p.p. 155-168. ed. Wiley-Blackell.
162. Meinhardt S., Ali S., Ling H. et Franc L. 2003. A new race of *Pyrenophora tritici-repentis* that produces a putative host selective toxin. In Proceeding of the fourth International Wheat Tan spot and spot Blotch Workshop J.B. Rasmussen, T.L. Frisen et S. Ali (Eds.), , 21-24 July 2002, Bemidji, M.N.(pp.117-119).Fargo, ND/ North Dakota Agricultural Experimental Station , North Dakota State University.

163. Meinhardt S. W., Cheng W., Kwon C.Y, Donohue C.M. and Rasmussen B. 2002. Role of the Arginyl-Glycyl-Aspartic motif in the action of Ptr ToxA Produced by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Physiology*. 130: 1545-1551.
164. Misra A.P. and Singh R.A. 1972. Pathogenic differences amongst three isolates of *Helminthosporium tritici-repentis* and the performance of wheat varieties against them. *Indian Phytopathol*. 25: 350- 353.
165. Mergoum M., Froberg R.C., Ali S., Singh P.K., Rasmussen J.B. and Miller J.D. 2006. Registration of Spring Wheat Germplasm ND 735 Combining Tan Spot, Leaf, and Stem Rusts. *Crop Science*. 46: 1003-1004.
166. Michelmore R. W. and Hulbert S.H. 1987. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*. 25: 383-404.
167. Moreno M.V., Stenglein S.A., Ballati P.A., Perello A.E. 2008. Pathogenic and molecular variability among isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* , causal agent of tan spot of wheat in Argentina. *European Journal of Plant pathology*. 122 : 239- 252.
168. Moore D. and Frazer L.N. 2002. Essential Fungal Genetics. Ed. Springer-Verlag, New York, 357p.p.
169. Morgante M. And Olivieri A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal*. 3: 175-182.
170. Moreno M.V., Tacalitti M.S., Castro A.M., Perello A.E. 2007. Isozyme polymorphisms within *Pyrenophora tritici-repentis* population in Argentina. *World Journal of Microbial Biocontrol* .
171. Morral R.A.A, and Howard R.J.1975. The epidemiology of leaf spot disease in a native prairie. II. Air borne spore population of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Botany*. 53: 2345-2353.
172. Nagle B.J., Froberg R.C. and Hosford R.M. 1982. Inheritance of resistance to tan spot of wheat. In: Tan spot of wheat and related disease workshop. Ed. Hosford R.M. North Dakota State University, Fargo, 445p.
173. Najimi B., El Jaafari S., Jlibéne M. et Jacquemin J.M. 2003. Application des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 7 : 17- 35.
174. Nasraoui B. et Lepoivre P. 2003. Les champignons phytophagènes. p.p.111-142. In : *Phytopathologie*. ed. De Boeck Université, Bruxelles, 427p.
175. Nelson R.J. 1992. Analyzing pathogen populations using molecular markers. p.p. 89-98. In : *Biothechnology and Environmental Science: Molecular Approaches*. ed. S. Mongkolsuk , Plenum Press, New York.

176. Oliva R., Win J., Raffaele S., Boutemy L., Bozkurt T.O., Chaparro-Garcia A., Segretin M.E., Stam R., Schornack S, Cano L.M., Van Damme M., Huitema E., Thines M., Banfield M.J. and Kamoun S. 2010. Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cellular Microbiology*. 12: 705-715.
177. Oliver R.P. and Solomon P. S. 2008. Recent Fungal Disease of Crop Plants : Is Lateral Gene Transfer a Common Theme . *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 21: 287-293.
178. Orolaza N.P., Lamari L. and Balance G.M. 1995. Evidence of a host-specific protein toxin from *Pyrenophora tritici-repentis* , the causal agent of tan spot of wheat. *Phytopathology*. 85: 1282-1287.
179. Pandelova I., Betts M.F., Manning V.A., Wilhelm L.J., Mockler T.C. et Ciuffetti L.M. 2009. Analysis of transcriptome changes induced by Ptr ToxA in wheat provides insights into mechanisms of plant susceptibility . *Molecular Plant*. 2: 1067- 1083.
180. Pongam P., Osborn T.C. and Williams P.H.1999. Assessment of genetic variation among *Leptosipharia maculans* isolates using pathogenecity data and AFLP analysis. *Plant Disease*. 83: 149-154.
181. Parlevleit, J.E. 1983. Durable resistance in self-fertilizing annuals. In Durable Resistance in Crops. F. Lamberti, J.M. Walker, and N.A.. Van der Graaff, Eds. Plenum Publishing Co.
182. Parmasto, E. and Parmasto, I. 1992. Size and shape of basidiospores in the Hymenomycetes, *Mycologia Helvetica*. 5: 47-78.
183. Perello A., Monaco C., Simon M.R., Sisterna M. and Dal Bello G. 2003. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. *Crop protection*. 22: 1099-1106.
184. Perello A., Simon M.R. and Arambarri A.M. 2002. Interaction between Foliar Pathogens and the Saprophytic Microflora of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Phylloplane. *Journal of Phytopathology*. 150: 232-243.
185. Person C., 1959. Gene-for-Gene relationship in host-parasite systems. *Canadian Journal of Botany*. 37: 1101-1129.
186. Pfender W.F., Kraus J. And Loper J.E. 1993. A genomic region from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 required from pyrrolnitrin production and inhibition of *Pyrenophora tritici-repentis* in wheat straw. *Phytopathology* .83: 1223-1228.
187. Pfender W.F., King L.G. and Rabe J.R. 1991. Use of dual-strain fluorescence microscopy to observe antagonism of *Pyrenophora tritici-repentis* by *Limonomyces roseipellis* in wheat straw. *Phytopathology*. 81: 109-112.

188. Pfender W.F., Pacey C.A. and Zhang W. 1988. Saprothitic growth and pseudothecia production by *Pyrenophora tritici-repentis* in plant tissue held at controlled water potentials. *Phytopathology*. 78: 1205-1210.
189. Platt H.W. and Morrall R.A.A. 1980. Effects of light intensity and relative humidity on conidiation of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2: 53-57.
190. Platt H.W., Morrall R.A.A. and Guen H.E. 1977. The effects of substrate, temperature and photoperiod on conidiation of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Botany*. 55: 254-259.
191. Rasmussen J.B. 1997. Role of Host Metabolism in Action of Necrosis Toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. In: Helminthosporium Blights of Wheat : Spot Blotch and Tan Spot. Proceeding of International Workshop Held at CIMMYT .p.p.288-292. Eds. Duveiller E., Dubin H.J., Reeves J. and McNab A., El Batan, Mexico.
192. Raymond P.J., Bockus W.W. and Norman B.L. 1985. Tan spot of winter: Procedures to determine host response. *Phytopathology* . 75:686-690.
193. Reimann S. and Deising H.B. 2004. Inhibition of Efflux Transporter-Mediated Fungicide Resistance in *Pyrenophora tritici-repentis* by a Derivative of 4'-Hydroxyflavone and Enhancement of Fungicide Activity. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 3269-3275.
194. Rees R.G. 1987. Breeding for yellow spot resistance. In: Breeding for cereal resistance. p.p. 52-61. Ed. Kantzow D.R. Derera N. Australian Institute of Agricultural Science, New South.
195. WalesRees R.G. and Platz G.J. 1990. Sources of resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* in Bread wheat. *Euphytica*. 45: 59-69.
196. Rees R.G. and Platz G.J. 1983. Effect of yellow spot on wheat : comparison of epidemics at different stages of crop development . *Australian Journal of Agricultural Research*. 34: 39-46.
197. Rees R.G., Platz G.L. and Mayer R.J. 1982. Yield losses in wheat from yellow spot: Comparison of estimates derived from single tillers and plots. *Australian Journal of Agricultural Research*. 33:899-908.
198. Riaz M., Bockus W.W. and Davis M.A. 1991. Effects of wheat genotype, time after inoculation, and leaf age on conidia production by *Drechslera tritici-repentis*. *Phytopathology* .81: 1298-1302.
199. Rountree M. R., and Selker, E. U. 1997. DNA methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in *Neurospora crassa*. *Genes Development*. **11**: 2383–2395.

200. Sachs M.S., 1998. Posttranscriptional Control of Gene Expression in Filamentous Fungi. *Fungal. Fungal Genetics and Biology*. 23:117-125.
201. Sarma G.N., Manning V.A., Ciuffetti L.M. and Karplus P.A. 2005. Structure of Ptr ToxA: An RGD-Containing Host-Selective Toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant cell*. 17: 3190-3202.
202. Sayoud R., Ezahiri B. Et Bouznad Z. 1999. Les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires au Maghreb. Ed. I.T.G.C., Alger, 64p.
203. Schilder A.M.C. and Bergstrom G.C. 1992. The dispersal of conidia and ascospores of *Pyrenophora tritici-repentis*. In: Proceedings of the 2nd Tan Spot Workshop, Fargo, p.p. 96-99.
204. Schnieder F., Koch G., Jung C., Verret J.A. 1998. The application of molecular markers for genetic characterization of *Septoria tritici* population. *Journal of Plant Disease and Protection*. 105(5): 452-461.
205. Seidler H., Obst A., Hsam S.L.K. and Zeller F.J. 1994. Evaluation for resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* in *Aegilops tauschii* Coss. And synthetic hexaploid wheat amphiploids. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 41: 27-34.
206. Séraphin, B. 1995. Sm and Sm-like proteins belong to a large family: Identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs. *EMBO Journal*. 14: 2089–2098.
207. Sharma R.C. and Duveiller E. 2004. Effect of *Helminthosporium* of leaf blight on performance of timely and late-seeded wheat under optimal and stressed levels of soil fertility and moisture. *Field Crop Research*. 89: 205-218.
208. Sharma R.C, Duveiller E., Ahmed F., Arun B., Bhandari D., Bhatta M.R., Chand R., Chaurasiya P.C.P., Gharti D.B., Hossain M.H., Joshi A.K., Mahto B.N., Malaker P.K., Reza M.A., Rahman M., Samad M.A., Shaheed M.A., Biddique A.B., Singh A.K., Singh K.P., Singh R.N. and Singh S.P. 2004. *Helminthosporium* leaf blight resistance and agronomic performance of wheat genotypes across warm regions of South Asia. *Plant Breeding*. 123: 520-524.
209. Sharma R.C., Duveiller E., Gyawali S. Shrestha S.M., Chaudhary N.K. and Bhatta M.R. 2004. Resistance to *Helminthosporium* leaf blight and agronomic performance of spring wheat genotypes of diverse origins. *Euphytica*. 139: 33-44.
210. Sharma S., Duveiller E., Basnet R, Karki CB. And Sharma R.C. 2005. Effect of potash fertilization on *Helminthosporium* leaf blight severity in wheat, and associated increases in grain yield and kernel weight. *Field Crop Research*. 93:142-150.
211. Schilder A.M.C. and Bergstrom G.C. 1994. Infection of Wheat seed by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Botany*. 72:510-519.

212. Schilder A.M.C.1993. Aspects of epidemiology of tan spot of wheat in New York. PhD thesis, Cornell University, 195p.
213. Schilder A.M.C. and Bergstorm G.C. 1992a. The dispersal of conidia and ascospores of *Pyrenophora tritici-repentis* . In: Advances in tan spot research. p.p. 96-99 .eds. Franc L.J., Krupinsky J.M. and McMullen M.P. North Dakota Agric. Exp. Station, Fargo, USA.
214. Schilder A.M.C. and Bergstorm G.C. 1992b. Infection of wheat seed and seed transmission of *Pyrenophora tritici-repentis*. In: Advances in tan spot research. p.p. 56-60. eds. Franc L.J., Krupinsky J.M. and McMullen M.P. North Dakota Agric. Exp. Station, Fargo, USA
215. Schilder A.M.C. and Bergstrom G.C. 1990. Variation in Virulence within the population of *Pyrenophora tritici-repentis* in New York. *Phytopathology*. 80: 84-90.
216. Schuur T. A., Schaeffer E. A. M. and Wessels, J. G. H. 1997. Homology-dependent silencing of the *SC3* gene in *Schizophyllum commune*. *Genetics* 147: 589–596.
217. Shoemaker R.A. 1962. *Drechslera* Ito. *Canadian Journal of Botanic*. 40: 809-839.
218. Simoglou K.B. and Dordas C. 2006. Effect of foliar applied boron, manganese and zinc on tan spot in winter durum wheat. *Crop protection*. 25: 657-663.
219. Singh P.K., Singh R.P., Duveiller E., Mergoum M., Adhikari T.B. and Elias E.M. 2010a. Genetic of Wheat-*Pyrenophora tritici-repentis* interactions. *Euphytica*.171: 1-13.
220. Singh P.K., Mergoum M., Adhikari T.B., Shah T., Ghavami F., Kianian S.F. 2010b. Genetic and molecular analysis of wheat tan spot resistance effective against *Pyrenophora tritici-repentis* races 2 and 5. *Molecular Breeding*. 25:369–379
221. Singh P.K., Mergoum M., Ali S., Adhikari T.B., Hughes G.R. 2008a. Genetic analysis of resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* races 1 and 5 in tetraploid and hexaploid wheat. *Phytopathology*. 98: 702-707.
222. Singh P.K., Mergoum M., Gonzalez-Hernandez J.L, Ali S., Adhikari T.B.and Kianian S.F. 2008b. Genetic analysis and mapping of resistance to necrosis inducing race 5 of *Pyrenophora tritici-repentis* in tetraploid wheat .*Molecular Breeding*. 21: 293-304.
223. Singh P.K., Mergoum M., Ghavami F., Ali S., Adhikari T.B Kianian S.F. 2008c. Genetic analysis and mapping of tan spot resistance gene using DarT markers. *Phytopathology*. 98: 147.
224. Singh P.K., Bockus W.W., Sharma L. and Bowden R.L. 2008d. A novel source of resistance in wheat to *Pyrenophora tritici-repentis* race 1. *Plant Disease*. 92: 95. .

225. Singh P.K. and Mergoum M. 2006. Evaluation of elite wheat plasm for resistance to tan spot. *Plant Disease*.90: 1320- 1325.
226. Singh P.K. and Hughes G.R., 2006a. Genetic similarity among isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat. *Journal of Phytopathology* .154: 178-184.
227. Singh P.K. and Hughes G.R. 2006b. Inheritance of resistance of the chlorosis component of tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis* race 3. *Phytopathology* .96: 885-889.
228. Singh P.K., Gonzalez-Hernandez J.L., Mergoum M., Ali S., Adhikari T.B., Kianian S.F., Elias E.M. and Hughes GR . 2006a. Identification and molecular mapping of a gene in tetraploid wheat conferring resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* race 3. *Phytopathology*. 96: 885-889.
229. Singh P.K., Mergoum M., Ali S., Adhikari T.B., Elias E.M. and Hughes G.R. 2006b. Identification of new sources of resistance to tan spot, *Stagonospora Nodorum* blotch, and *Septoria Tritici* blotch of Wheat. *Crop Science*. 46: 2047-2053.
230. Singh P.K. and Hughes G.R. 2005. Genetic control of resistance to tan spot induced by *Pyrenophora tritici-repentis* race 1 and 2, in spring and winter wheat genotypes. *Phytopathology*. 95: 172-177.
231. Singh P.K. 2001. *Genetic studies on the resistance to tan spot of wheat and genetic similarity among isolates of Pyrenophora tritici-repentis*. PhD thesis, University of Saskatchewan, Canada 144p.
232. Southern, E.M. 1979. Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods in enzymology*. 68: 152-76.
233. Stock, W. S., Brûlé-Babel, A. L., and Penner, G. A. 1996. A gene for resistance to a necrosis-inducing isolate of *Pyrenophora tritici-repentis* located on 5BL of *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring. *Genome*. 39:598-604.
234. Strelkov, S.E. 2002. Occurrence and expression of ToxB and comparative virulence of chlorosis inducing races of *Pyrenophora tritici-repentis*. Ph.D. thesis , University of Manitoba, Winnipeg.
235. Strelkov S.E., Kowatsch R.F., Ballance G.M. and Lamari L. 2006. Characterization of the *ToxB* gene from North Africa and Canadian isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiological and . Molecular Plant Pathology*. 67: 164-170.
236. Strelkov S.E. and Lamari L .2003. Host- parasite interactions in tan spot [*Pyrenophora tritici- repentis*] of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25:339-349.

237. Strelkov S.E., Kowatsch R.F., Ballance G.M. and Lamari L. 2003. Occurrence and expression of ToxB and comparative virulence chlorosis inducing races of *Pyrenophora tritici-repentis*. In: Proceeding of the Fourth International Wheat Tan Spot and Spot Blotch Workshop. 21-24 July , Bemidji , Mini. Edited by J.B. Rasmussen, T.L. Friesen and S. Ali North Dakota Agricultural Experimental Station, North Dakota State University, Fargo, N.D.pp.368-368.
238. Strelkov S.E. 2002. Occurrence and expression of ToxB and comparative virulence chlorosis inducing races of *Pyrenophora tritici-repentis* . Ph.D. thesis, University of Manitoba. Winnipeg.
239. Strelkov S.E., L. Lamari, R. Sayoud and R. Smith. 2002. Comparative virulence of chlorosis-inducing races of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Journal of Plant Pathology* 24: 29-35.
240. Strelkov S.E, Lamari L., and Ballance G.M. 1999. Characterization of a host-specific protein toxin (Ptr ToxB) from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 12:728–32
241. Strelkov S.E., Lamari L. and Ballance G.M. 1998. Induced chlorophyll degradation by a chlorosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20: 428-35
242. Stukenbrock E.H. and McDonald B.A. 2009. Population Genetics of Fungal and Oomycete Effectors Involved in Gene-for-Gene Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 22(4): 371-380.
243. Stukenbrock E.H., Banke S., and McDonald B.A. 2006. Global migration patterns in the fungal wheat pathogen *Phaeosphaeria nodorum*. *Molecular Ecology*. 10 : 1-10.
244. Sun X. 2004. *Genetic characterisation of wheat genes resistance to tan spot and leaf rust*. Thèse de Master of Science, Kansas State University, Manhattan, Kansas, 121p.
245. Summerell B.A. and Burgess L.W. 1989. Factors influencing survival of *Pyrenophora tritici-repentis*: Stubble management. *Mycologia Research*. 93: 38-40.
246. Sutton J.C. and Peng G. 1993. Manipulation and vectoring of biocontrol organism to manage foliar and fruits diseases in cropping systems. *Annual Review of Phytopathology*. 31:473-493.
247. Sutton J.C. and Vyn T.J. 1990. Crop sequences and tillage practices in relation to diseases of winter in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 12: 358-368.

248. Tadesse W., Hasam S.L.K., Wenzel G. and Zeller F.J. 2006a. Identification and monosomic analysis of tan spot resistance gene in synthetic wheat lines (*Triticum turgidum* L. x *Aegilops tauchii* Coss.). *Crop Science*. 46: 1212-1217.
249. Tadesse W., Schmolke M., Hsam S.L.K., Mohler V., Wenzel G. and Zeller F.J. 2007. Molecular mapping of resistance genes for tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis* race 1) in synthetic wheat lines. *Theoretical Applied Genetics* 114: 855-862.
250. Tadesse W., Hsam S.L.K., Wenzel G. and Zeller F.J. 2008. Chromosome location of a gene conferring resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* in Ethiopian wheat cultivars. *Euphytica*. 162: 423-430.
251. Tollervey D., and Mattaj J.W. 1987. Fungal small nuclear ribonucleoproteins share properties with plant and vertebrate U-snRNPs. *EMBO Journal*. 6: 469-476.
252. Tollervey D., Tress G., and Lührmann R. 1990. Immunoprecipitation distinguishes non-overlapping groups of snRNPs in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Research*. 18: 5207-5212.
253. Tomas A., Feng G.H., Reek G.R., Bockus W.W. and Leach J.E. 1990. Purification of a cultivar-specific toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat. *Molecular plant-microbe interactions* 3:221-224.
254. Tuori R.P. Wopler T.J. and Ciuffeti L.M. 1995. Purification and immunological characterization of toxin compounds from cultures of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant-Microbe Interact.* 8: 41-48.
255. Vakalounakis D.J. and Fragkiadakis G.A. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber : Differentiation by pathogenicity vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting. *Phytopathology*. 89: 161-168.
256. Vavilov N.I. 1951. Origin, variation immunity and breeding of cultivated plants. Selected writing, Chronica Botanica Co., Waltham, 60p.
257. Verschuere M., Lognay G. et Marlier M. 2002. Revue bibliographique : les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 6: 131-142.
258. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
259. Wakulinski W, Kachlicki P, Sobiczewski P, Schollenberger M, Zamorski Cz, and Gotocka B, I. 2003. Catenarin production by isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler and its antimicrobial activity. *Journal of Phytopathology*. 151:74-9.

260. Williams J.G.K., Kubelki A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18 : 6531-6533.
261. Wegulo S.N., Klein R.N. and Harveson R.M. 2006. Tan spot disease of wheat. Ed. University of Nebraska, 3p.
262. Weise MW.1987. Tan spot (yellow leaf spot). In: *Compendium of wheat disease* .p.p. 42-43. ed. American Phytopathological Society, St. Paul, 112p.p.
263. Welz H.G., Köhler W. and Leonard K. 1993. Isozyme variation within and among pathogenic races of *Cochliobolus carbonum* on Corn in North California. *Molecular Ecology. Phytophathology.* 84: 31-38.
264. Wolpert T.J., Dunkle L.D., and Ciuffetti L.M. 2002. Host selective toxins and avirulence determinants : What's in a name ? *Annual Review of Phytopathology.* 40: 251-285.
265. Wright K.H. and Sutton J.C. 1990. Inoculum of *Pyrenophora tritici-repentis* in relation to epidemics of tan spot of winter in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology.* 12: 149-157.
266. Xu J. 2010. Fundamentals of Fungal Molecular Population Genetic Analysis. *Current Issues in Molecular Biology.* 8: 75-90.
267. Xu, J., Mitchell, T.G., and Vilgalys, R.J. 1999. PCR restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses reveal both extensive clonality and local genetic differences in *candida albicans*. *Molecular Ecology.* 8: 59-73.
268. Xu S.S., Friesen T.L. and Mujeeb-Kazi A. Seedling resistance to tan spot and *Stagonospora nodorum* blotch in synthetic hexaploid wheats. *Crop Science.* 44: 2238-2245.
269. Zhang X. and Jin Y. 1998. Sensitivity of Ptr ToxA and tan spot infection responses in *Aegilops Triticum* complex. *Canadian Journal of Plant Pathology.*20:415-418.
270. Zhang H.F., Franc L.J. Jordahl J.G. and Meinhardt S.W. 1997. Structural and physical proprieties of necrosis-inducing toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology* . 87:154-160.
271. Zeiders K.E. 1989. A variable-spored of *Drechlera dactylidis* Pathogenic on Orchardgrass and Corn. *Plant Diseases.* 64(2): 211- 213.
272. Zillinsky F.J. 1983. Maladies communes des céréales à paille: Guide d'identification. Ed. CIMMYT, Londres, 141p.

Annexes

I. Tampon TE (Tris 10mM, EDTA 1mM)

1. Tris (10mM) :	Tris	1,211g
	Eau distillée	complétée à 1l
2. EDTA(500mM pH 8,0) :	EDTA	186,115g
	Eau distillée	complétée à 1l
	Le pH est amené à 8 en utilisant des pastilles de NaOH	
3. (Tris 10mM, EDTA 1mM) :	Tris (10mM)	0,5ml
	EDTA (500mM pH 8,0)	0,1ml
	Eau distillée	complétée 50ml

II. Tampon TBE (5X)

Tris-base	54g
Acide Borique	27,5g
EDTA (500ml, pH 8,0)	20ml
Eau distillé	complétée à 1l

III. Tampon TAE (50X)

Tris-base	242g
Acide acétique glacial	57,1 ml
EDTA (500mM, pH 8,0)	100ml
Eau distillé	complétée à 1l

IV. Tampon de charge pour gel d'agarose (6X)

SDS 20%	37,5µl
Bleu de Bromophénol 2%	37,5µl
Xylene Cyanol 2%	37,5µl
EDTA 0,5	150µl
Ficoll 400 30%	625µl
H ₂ Odd	113,0µl

V. Tableau des valeurs propres :

Val. Propres (acp croissance.sta)				
Extraction: Composantes Princ.				
		% Total	Cumul	Cumul
	ValPropr	Variance	ValPropr	%age
1	2,1361741	71,2058035	2,1361741	71,2058035
2	0,49108987	16,3696622	2,62726397	87,5754657
3	0,37273603	12,4245343	3	100

VI. Poids Factoriels résultants de l'Analyse en Composantes Principales :

Coordonnées des variables (Coordonnées des températures sur le cercle des corrélations) basées sur les corrélations.

Poids Factor. (Sans Rot.) (acp croissance.sta)			
Extraction: Composantes Princ.			
(Poids marqués > ,700000)			
	Fact.	Fact.	Fact.
	1	2	3
T1	0,87132457	0,04687923	0,48846273
T2	0,8345036	0,46620099	0,29370118
T3	0,82496749	0,52110348	0,21881455
Var Expl	2,1361741	0,49108987	0,37273603
Prp. Tot	0,71205803	0,16369662	0,12424534

VII. Matrice de similarité de Jaccard

[illegible]

Résumé

La tache bronzée du blé causée par *Pyrenophora tritici-repentis* est devenue une des maladies foliaires du blé les plus présentes en Algérie. Une prospection des différentes zones céréalières du pays a été réalisée sur les cultures de blé durant trois campagnes agricoles. Elle a permis de collecter 214 échantillons au niveau de 66 localités dans les 15 Wilayas et de construire une collection d'isolats de *P. tritici-repentis*. La caractérisation morphologique d'un ensemble d'isolats en considérant les mensurations des spores et la croissance radiale des cultures à différentes températures, a montré l'existence d'une différence très hautement significative entre les isolats étudiés. Celle-ci, a touché la longueur de la spore et le nombre de ses septa. L'optimum de croissance est atteint pour la plus part des isolats à 25°C. Les inoculations artificielles ont révélé la présence dans nos champs de six races différentes 1, 4, 5, 6, 7 et 8, avec une prédominance des races 1 et 7. Quatre races (1, 4, 7 et 8) sont rapportées pour la première fois en Algérie. La présence d'un nouveau profil de virulence qui ne correspond à aucune des 8 races connues à ce jour a également été notée. Ce qui révèle la présence dans nos zones céréalières d'une nouvelle race (proposée comme race 9). L'amplification des gènes de virulence ToxA et ToxB chez l'ensemble des isolats inoculés nous a permis de conclure que pour 48 isolats sur les 55 étudiés, la caractérisation phénotypique correspond à la caractérisation génotypique. Pour le reste des isolats, l'expression de l'un des deux symptômes (Chlorose ou nécrose) en absence du gène responsable de la synthèse de la toxine correspondante au symptôme exprimé, suggère la présence de nouvelles toxines chez ces isolats, encore inconnues. La recherche des gènes ToxA et ToxB chez les isolats ayants montré un nouveau profil de virulence a révélé la présence des deux gènes malgré l'absence des symptômes habituellement induits par leur produits. Ceci laisse supposer l'existence d'homologues pour ces deux gènes non connus encore. La présence d'un homologue de ToxA chez l'espèce *P. tritici-repentis* est une première. Le séquençage des amplicons et l'alignement des séquences obtenues pour chacun des deux gènes et leur comparaison avec les séquences de référence des gènes ToxA et ToxB, ne montre aucune différence pour la région analysée. La synthèse des deux toxines, produits des gènes ToxA et ToxB, pourrait être affectée par l'un des différents facteurs contrôlant la biosynthèse d'une protéine chez les organismes eucaryotes. L'analyse de la diversité génétique de 61 isolats provenant de différentes régions céréalières du pays et appartenant à différentes races a été effectuée grâce à la techniques fAFLP. Pour ce faire 78 couples amorces ont été testé et 12 sélectionnées pour l'étude. Une importante variabilité génétique a été mise en évidence. Aucune corrélation n'a été trouvée entre la diversité génétique et le type de race, l'espèce hôte ou l'origine géographique. Un isolat ayant montré le nouveau profil de virulence s'est clairement distingué sur le plan moléculaire.

Mots clés : *Pyrenophora tritici-repentis*, Tan spot, race, ToxA, ToxB, diversité génétique, fAFLP

Summary

Tan spot of wheat caused by the fungus *Pyrenophora tritici-repentis* has become a major component of the leaf spot disease complex in Algerian fields. A survey in wheat growing areas was carried out during three growing seasons. 214 samples at 66 locations in 15 Wilayas collected and an isolates collection of *P. tritici-repentis* was made. Morphological characterization of a set of isolates, considering spores measurements radial growth cultures at different temperatures showed the existence of a very highly significant difference between the studied isolates. This has affected the length of the spore and the number of septa. The optimum growth is achieved for most of the isolates at 25 ° C. Artificial inoculations have revealed the presence in our fields of six different races 1, 4, 5, 6, 7 and 8, with a predominance of races 1 and 7. Four races (1, 4, 7 and 8) are reported for the first time in Algeria. The presence of a new virulence pattern that does not match any of the eight known races also has discovered. This reveals the presence in our wheat growing areas of a new race (race 9 as proposed). The amplification of virulence genes ToxA and ToxB from DNA inoculated isolates, showed that for 48 isolates among the 55 studied, the phenotypic characterization corresponds to their genotypic characterization. For the remaining isolates, expression of one of the two symptoms (chlorosis or necrosis) in the absence of the gene responsible for the toxin synthesis allowed the symptom expressed, suggesting the presence of new toxins in these isolates, as yet unknown. Looking for ToxA and ToxB genes in isolates showed a new virulence pattern, revealed the presence of the two genes despite the absence of symptoms induced by their products. This suggests the existence of homologous for these two genes not yet known. The presence of a ToxA homologous in *P. tritici-repentis* specie is reported for the first time. Sequencing and alignment of obtained sequences for the two genes, and their comparison with ToxA and ToxB reference sequences, shows no difference for the analyzed region. Consequently, the synthesis of the two toxins, PtrToxA and PtrToxB, could be affected by one of several factors controlling the biosynthesis of a protein in eukaryotic organisms. Analysis of genetic diversity of 61 isolates from different geographic origin belonging to different races using fAFLP analysis was done. For this, 78 primers were tested and 12 selected for the study. A significant genetic variability has been demonstrated. No correlation was found between genetic diversity and race classification, host species or geographic origin. One isolate that showed the new virulence pattern was clearly distinguished at the molecular level.

Key Words: *Pyrenophora tritici-repentis*, Tan spot, race, ToxA, ToxB, genetic diversity, fAFLP

ملخص

يعتبر مرض التبقيع الصدني من أضرار القمح الأكثر شيوعا في الجزائر، تمت معاينة العدد من الحقول عبر مختلف مناطق زراعة القمح و هذا خلال ثلاث مواسم متتالية، مما أمكن من جمع 214 عينة نباتية على مستوى 66 منطقة موزعة عبر 15 ولاية و الحصول على مجموعة غزالات لسبب المرض *P-sitneper* *icitirt arohponery*. ان دراسة الخصائص المرفولوجية لمجموعة من الغزالات اعتمادا على مقاييس البوغة و نمو المستعمرات في ثلاث درجات حرارة مختلفة ، أظهر و جود تباين بين الغزالات من حيث طول البوغة ودرجة نتمو المستعمرة كما تبين أنه عموما ، يحصل أحسن نمو في درجة حرارة 25. أظهر نقل العدوة اصطناعيا لمجموعة أصناف القمح الاختلافية ، وجود 6 سلالات لهذا الفطر في الحقول الجزائرية ، 4 منها يتم اكتشافها لأول مرة. أمكنت كذلك النتائج من اكتشاف نمط شراسة جديد مما يوحي بتواجد سلالة جديد تم اقتراحها كسلالة 9 (Race 9). أما التنقيب عن المورثتان *AxoT* و *BxoT* المسنولتين عن فوع *P. icitirt-sitneper* باستعمال تقنية تفاعل البوليميريز التسلسل (PCR) فقد أظهر تطابق النتائج مع تلك المتحصل عليها من خلال العدوة الاصطناعية لمجموعة الأصناف إلا خلافاً بالنسبة ل 48 عزلة من بين ال 55 المدروسة أما النتائج الملاحظة بالنسبة للغزالات المتبقية، التي سببت أحد أعراض مع عدو تواجد المورثات المسببة لهذه الأعراض فإنها توحي بوجود توكسينات لدى هذا الفطر غير معروفة بعد. كما أن التنقيب عن المورثات *AxoT* و *BxoT* لدى الهزالات التي أظهرت نمط شراسة جديد ، أثبت تواجد هذه المورثات و تطابق في الترتيب الخطي المعروف عند *AxoT* و *BxoT* في المنطقة المدروسة من الحمض النووي. ان تواجد *AxoT* و *BxoT* في غياب الأعراض المعروفة للمرض التي تسببها التوكسينات *AxoTrPt* و *BxoTrPt*, يوحي بوجود مورثات متجانسة ل *AxoT* و *BxoT* غير معروفة لحد الآن. أن اكتشاف اليل للمورثة *AoxT* لدى *P. icitirt-sitneper* سابقة أولى، أما غياب الأعراض مع تواجد *AxoT* و *BxoT* قد يعود الى أسباب مختلفة أدت إلى تعطيل عمل المورثتان، وذاك قد يكون خلال عملنا نسخ الحمض النووي أو ترجمته أو بعد ذلك كما تمت دراسة التنوع الجيني في الحمض النووي لدى 61 عزالة من مصادر جغرافية متعددة و سلالة مختلفة، من أجل ذلك استعملت تقنية، عديد التكوين دو القطعة الطويلة المضخمة "PLFA" حيث تم تجربة 78 بادئ، و تنقية 12 منها استعملت في هذه الدراسة. أظهرت النتائج اختلاف جزيئي كبير د ليل على اختلاف ورائي كبير بين الغزالات، في حين لم يسجل أي ارتباط بين التباين الجيني الملا حظ و المصدر الجغرافي للغزالة أو نوع السلاطة أو نمط العائل، كما أظهرت إحدى الغزالات ذات نمط الشراسة الجديد اختلاف جزيئي كبير بالنسبة للغزالات الأخرى.

كلمات المفتاح: *Pyrenophora tritici-repentis*, سلالة تبقيع الصدني *ATox* و *BTox* التنوع الجيني