

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
المدرسة الوطنية العليا للفلاحة , الحراش , الجزائر
Ecole Nationale Supérieure Agronomique (E.N.S.A.), El-Harrach, Alger



Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT en Sciences Agronomiques

**Diversité phénotypique et géotypique des populations de
Mycosphaerella graminicola (= *Zymoseptoria tritici*) agent de
la septoriose du blé en Algérie**

Réalisée par : Mme. Wahiba HARRAT

Jury

Président :	A. MEKLCHE	MCA – E.N.S.A.
Directeur de thèse :	Z. BOUZNAD	Pr. – E.N.S.A.
Examineurs :	A. BENBELKACEM	Directeur de recherche - INRAA
	B. SETTI	MCA – Université de CHLEF

Soutenu le : 12/01/2017

REMERCIEMENTS

Je remercie avant tout, le bon Dieu qui m'a donné la volonté et l'énergie de réaliser ce modeste travail.

J'exprime mes sincères remerciements à M. BOUZNAD Z., Prof. à l'ENSA et mon Directeur de thèse, qui a suivi ce travail avec beaucoup d'intérêt. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et mon profond respect pour ses précieux conseils, son aide et sa disponibilité.

Je remercie, M. MEKLIICHE A., M.C.A. à l'ENSA, de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ma soutenance.

Un grand remerciement à M. BENBELKACEM A., Directeur de recherche à l'INRAA, d'avoir accepté d'examiner notre travail de recherche.

Un chaleureux remerciement à M. SETTI B., M.C.A. à l'Université de CHLEF, de nous avoir honoré de sa présence et d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Je remercie sincèrement la Directrice du Centre de Recherche en Biotechnologie (C.R.Bt), Prof. BENBOUZA H. de m'avoir autorisé l'accès au « Laboratoire de biologie moléculaire », aussi, le personnel du laboratoire pour son aide et le sérieux dont ils ont fait preuve.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mme. Fatima Ingénieur des laboratoires du département botanique, pour tous ses conseils et son aide le long de la réalisation de ma thèse, qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance la plus sincère.

Je tiens aussi à remercier toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Mme. HARRAT W.

DEDICACES

Je dédie ce travail à ma chère mère qui s'est tant battue pour mon bien être, pour sa bienveillance et sa force qu'elle me transmet pour traverser les plus difficiles épreuves.

A mon père pour sa tendresse et sa patience. Que dieu les garde pour moi.

A mon mari pour toute l'aide qu'il m'apporte.

A ma sœur Ghania, pour l'amour et l'affection qu'elle me donne ainsi qu'au courage et la volonté qu'elle m'inspire.

A mes sœurs Hayet, Rahima et Fariza, ainsi qu'à mes beaux-frères pour m'avoir épaulé à chaque fois que j'en avais besoin.

A ma fille ainsi qu'à mes neveux et nièces, pour le bonheur qu'ils me procurent.

A mon amie Lamia pour m'avoir soutenu tout au long de cette épreuve.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

Wahiba

S o m m a i r e

Liste des tableaux

Liste des figures

INTRODUCTION GENERALE	1
-----------------------------	---

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le blé dans le monde.....	5
2. Présentation de la maladie	7
2.1. Taxonomie et nomenclature	7
2.2. Symptomatologie de la maladie	8
2.3. Processus d'infection du pathogène.....	9
2.3.1. Pénétration du champignon	11
2.3.2. Colonisation du tissu végétal	11
2.3.3. Formation des fructifications.....	13
2.3.4. Epidémiologie de la maladie	14
3. Spécialisation physiologique	16
4. Variabilité génétique de <i>M. graminicola</i>	17
5. Méthodes de lutte	20
5.1. Utilisation de variétés résistantes	20
5.2. Pratiques culturales	21
5.3. Lutte chimique	22
5.4. Lutte biologique	23

MATERIEL ET METHODES

1. Prévalence de la septoriose en Algérie	25
1.1. Régions et périodes des prospections	25
1.2. Méthode d'échantillonnage	25
1.3. Diagnostic et quantification de la maladie au champ	25
2. Isolement et caractérisation morfo-culturelle.....	27
3. Evaluation de l'agressivité des isolats	28
3.1. Matériel fongique.....	29
3.2. Matériel végétal.....	30
3.3. Préparation de l'inoculum, inoculation et quantification de la maladie	30
3.4. Analyse statistique.....	31
4. Variabilité génotypique des isolats de <i>Z. tritici</i>	31
4.1. Extraction d'ADN	32
4.1.1. Préparation du matériel fongique.....	32
4.1.2. Préparation du tampon d'extraction	32

4.1.3.	Extraction de l'ADN	33
4.2.	Détermination des mating types	33
4.2.1.	Amorces des mating types.....	33
4.2.2.	Réactions PCR (Polymerase Chain Reaction).....	34
4.2.3.	Migration pour la séparation des fragments sur gel d'agarose et visualisation des profils	34
4.3.	Evaluation de la diversité génotypique par les analyses SSR (Simple Sequence Repeat)	35
4.3.1.	Amorces des SSR testés	35
4.3.2.	Réactions PCR	35
4.3.3.	Révélation sur gel dénaturant (gel polyacrylamide).....	37
4.3.4.	Analyse des données	39
5.	Recherche et caractérisation de la forme parfaite <i>M. graminicola</i>.....	40
5.1.	Echantillonnage et prélèvement au champ	40
5.2.	Observations microscopiques des organes du téléomorphe : pseudothèces, asques et ascospores	40
5.3.	Mensurations des pseudothèces, asques et ascospores.....	41
5.4.	Technique d'isolement des ascospores	41
6.	Essais de méthodes de lutte contre <i>Z. tritici</i>	41
6.1.	Effet de la fertilisation azotée et potassique sur le développement de la maladie	41
6.1.1.	Présentation de l'essai	41
6.1.2.	Inoculation en plein champ	42
6.1.3.	Paramètres étudiés.....	42
6.1.4.	Analyse statistique	43
6.2.	Test de lutte chimique	43
6.2.1.	Choix des matières actives.....	43
6.2.2.	Technique des puits	43
6.2.3.	Estimation du taux de croissance des colonies de <i>Z. tritici</i>	44
6.2.4.	Analyses statistiques	44
6.3.	Lutte biologique	45
6.3.1.	Matériel fongique utilisé	45
6.3.2.	Activité des filtrats des <i>Trichoderma sp.</i>	45
6.3.3.	Technique des puits	45
6.3.4.	Estimation du taux de croissance des colonies de <i>Z. tritici</i>	46
6.3.5.	Analyses statistiques	46

RESULTATS ET INTERPRETATION

1.	Occurrence et sévérité de la tache septorienne en Algérie.....	48
2.	Caractérisation morphologique des isolats de <i>Z. tritici</i>	51
3.	Agressivité des isolats et comportement variétal	53
4.	Variabilité génotypique.....	57
4.1.	Détermination des mating types	57
4.2.	Analyses par les marqueurs SSR (Simple Sequence Repeat).....	59
5.	Recherche et caractérisation de la forme parfaite <i>M. graminicola</i>.....	66
6.	Méthodes de lutte contre <i>Z. tritici</i>	68

6.1.	Effet de la fertilisation azotée et potassique	68
6.2.	Lutte chimique	70
6.2.1.	Propiconazole	70
6.2.2.	Epoxyconazole.....	70
6.2.3.	Tébuconazole.....	71
6.2.4.	Trifluyxystrobine.....	72
6.3.	Lutte biologique à l'aide de <i>Trichoderma sp.</i>	76

DISCUSSION

1.	Occurrence et sévérité de la tache septorienne en Algérie.....	79
2.	Caractérisation morphologique de l'agent causal de la tache septorienne : <i>Z. tritici</i>	80
3.	Agressivité des isolats de <i>Z. tritici</i> et évaluation du comportement variétal....	80
4.	Variabilité génotypique de <i>Z. tritici</i>	82
5.	Recherche et caractérisation de la forme parfaite <i>M. graminicola</i>	84
6.	Méthodes de lutte contre <i>Z. tritici</i>	85
	CONCLUSION GENERALE.....	89

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

RESUMES

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification de <i>Z. tritici</i>	8
Tableau 2 : Provenance des isolats de <i>Z. tritici</i>	29
Tableau 3 : Gamme variétale (CNCC, 2009)	30
Tableau 4 : Composition du tampon d'extraction.....	32
Tableau 5 : Séquences des amorces SSR testées.....	36
Tableau 6 : Cycles d'amplification des réactions PCR pour les amorces SSR.....	37
Tableau 7 : Composition et réparation du gel dénaturant à 6%.....	38
Tableau 8 : Traitements de fertilisation expérimentés.....	42
Tableau 9 : Prévalence et sévérité de la tache septorienne du blé en Algérie	49
Tableau 10 : Classification en groupes homogènes des 26 isolats étudiés de <i>Z. tritici</i> selon leur agressivité.....	54
Tableau 11 : Classification des groupes homogènes représentant le comportement des 16 variétés étudiées de blé dur, blé tendre et triticale	55
Tableau 12 : Classification des isolats selon les mating type (mat 1-1 et mat 1-2).....	58
Tableau 13 : Matrice des résultats de l'amplification des neuf amorces SSR avec les 30 isolats, nombre d'allèles et la taille des amplicons (pb).....	61
Tableau 14 : Température optimale d'hybridation, intervalle de taille des fragments et le nombre d'allèles détectés en utilisant neuf amorces microsatellites.....	63
Tableau 15 : Dimensions (μm) des pseudothèces, asques et ascospores de <i>Mycosphaerella graminicola</i> comparées avec des données bibliographiques	66
Tableau 16 : Evolution de la maladie selon les modalités de fertilisation et les stades de culture	69
Tableau 17 : Valeurs moyennes du rendement estimé en grain selon les modalités de fertilisation	69
Tableau 18 : Taux de croissance des isolats de <i>Z. tritici</i> (%) par matière active.....	74
Tableau 19 : Taux de croissance des isolats de <i>Z. tritici</i> (%) en présence des filtrats des isolats de <i>Trichoderma sp</i>	77

Liste des figures

Figure 1 : Moyennes de rendements en blé pour les 10 principaux producteurs dans le monde entre 1994 et 2014 (FAOSTAT, 2016)	6
Figure 2 : Superficies récoltées et production de blé en Algérie entre 1994 et 2014 (FAOSTAT, 2016)....	6
Figure 3 : Symptômes et aspects des fructifications de la maladie de la tache septorienne	10
Figure 4 : Etapes de l'infection des plantes par <i>Z. tritici</i> (Steinberg, 2015).....	12
Figure 5 : Dynamique annuelle de <i>Zymoseptoria tritici</i> agent causale de la tache septorienne du blé (Suffert <i>et al.</i> , 2011)	15
Figure 6 : Zones à vocation céréalière et Wilayate prospectées pour la maladie de la tache septorienne en Algérie	26
Figure 7 : Méthode d'échantillonnage X-shaped de Campbell et Madden (1990).....	26
Figure 8 : Echelle Double digit (00-99) décrite par Eyal (1987).....	27
Figure 9 : Essai « Evaluation de l'agressivité des isolats »	28
Figure 10 : Echelle du taux de recouvrement pycnidial décrite par Ziv et Eyal (1978).....	31
Figure 11 : Technique des puits.....	44
Figure 12 : Symptômes caractéristiques de la tache septorienne du blé en plein champ.	50
Figure 13 : Différents aspects des cirrhes de <i>Z. tritici</i>	51
Figure 14 : Caractérisation culturelle et microscopique de <i>Z. tritici</i> sur milieux YMA	52
Figure 15 : Classification hiérarchique (Distances Euclidiennes) des isolats (1 et 2) et des variétés (3 et 4)	56
Figure 16 : Symptômes engendrés par l'isolat ST21 sur la variété HD1220 de blé tendre selon l'échelle décrite par Ziv et Eyal (1978)	57
Figure 17 : Gèle agarose de la Multiplex-PCR pour la détermination des mating type de <i>Z. tritici</i>	59
Figure 18 : Révélation sur gel polyacrilamide (marqueurs de types SSR)	60
Figure 19 : Schéma récapitulatif de l'ensemble des amplicons révélés sur gel polyacrylamide des 30 isolats de <i>Z. tritici</i> avec les neuf amorces SSR	62
Figure 20 : Dendrogramme représentant les relations génétiques entre les 29 isolats de <i>Zymoseptoria tritici</i> en fonction des neuf amorces testées (selon le coefficient « Dice »).....	64
Figure 21 : Analyse en Composantes Principales des 30 isolats en fonction de l'amplification des 9 amorces SSR, en deux dimensions.....	65
Figure 22 : Analyse en Composantes Principales en trois dimensions.....	65
Figure 23 : Structure du téléomorphe et de l'anamorphe de <i>M. graminicola</i> (<i>Z. tritici</i>)	67
Figure 24 : Différents taux de croissance des isolats de <i>Z. tritici</i> en fonction des matières actives fongicides	73
Figure 25 : Taux de croissance des isolats de <i>Z. tritici</i> en fonction des matières actives fongicides.....	75
Figure 26 : Taux de croissance des isolats de <i>Z. tritici</i> en fonction des doses des matières actives fongicides	75
Figure 27 : Différents taux de croissance des isolats de <i>Z. tritici</i> en présence des filtrats d'isolats de <i>Trichoderma sp.</i>	76
Figure 28 : Taux de croissance de <i>Z. tritici</i> en fonction des filtrats d'isolats de <i>Trichoderma sp.</i>	77

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Les céréales, socle historique de la diète méditerranéenne, occupent encore aujourd'hui une place prépondérante à la fois dans la production agricole, l'agroalimentaire de l'Algérie et dans la consommation alimentaire des ménages.

La production des céréales, notamment les blés, en Algérie présente une caractéristique fondamentale depuis l'indépendance à travers l'extrême variabilité du volume des récoltes. Cette particularité témoigne d'une maîtrise insuffisante de cette culture et de l'indice des aléas climatiques (**Bencharif et Rastoin, 2007**). Cette production conduite en extensif est à caractère essentiellement pluvial. Il est donc, facile de prédire qu'elle ne pourrait satisfaire les demandes d'une population qui, dépassant actuellement les 36 millions d'habitants, est potentiellement et traditionnellement consommatrice de blé (**Rastoin et Benabderrazik, 2014**). Ce qui fait qu'une grande partie des besoins nationaux est couverte par les importations, dont le coût est de plus en plus élevé. En effet, les importations pour les deux premiers mois de l'année 2016 sont de 9 768 840 quintaux de blé tendre et de 2 086 198 quintaux de blé dur respectant une facture de 274,2 millions de dollars (**ONFAA, 2016**).

La production nationale de blé, en 2014, était estimée à 75,7% de blé dur soit 23 323 694 quintaux sur une surface emblavée de 1 180 332 hectares et 24,3% de blé tendre équivaut à 9 666 796 quintaux soit une superficie ensemencée de 546 910 hectares (**MADR, 2015**). Le blé dur reste ainsi la céréale prépondérante en Algérie. Généralement bien adapté aux conditions locales, sa production progresse au même rythme que celle du blé tendre. Le rendement moyen en blé du pays est estimé à 14,75 q/ha en 2014 situé loin derrière la productivité des pays méditerranéens d'Europe du sud avec une moyenne de 34,27 q/ha, il peut dépasser dans certains pays 70 q/ha comme c'est le cas en France avec une moyenne de 73,58 q/ha pour la même année (**FAOSTAT, 2016**). Ces différences s'expliquent à la fois par des conditions édapho-climatiques (stress abiotique), techniques et sanitaires (ravageurs, maladies et adventices).

Parmi les maladies fongiques prépondérantes observées sur les blés en Algérie la tache septorienne, le tan spot, la fusariose et les rouilles causant des diminutions de rendement considérables (**Sayoud et al., 1999**).

Mycosphaerella graminicola (Fuckel) J. Schröt. (anamorphe *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvlieg & Crous, anciennement dénommée *Septoria tritici* Desm.) (Quaedvlieg *et al.*, 2011) est l'agent causal de la maladie de la tache septorienne du blé. Elle est une des maladies les plus dévastatrices de cette culture (Fones et Gurr, 2015). De graves épidémies de cette maladie peuvent réduire les rendements de blé de 35 à 50% notamment en régions méditerranéenne (Ponomarenko *et al.*, 2011).

Au Maghreb, la septoriose est considérée comme la maladie du blé la plus importante (Zahri *et al.*, 2013 ; Berraies, 2014) ; en Algérie elle est largement présente dans toutes les régions Nord du pays (Sayoud *et al.*, 1999).

L'utilisation de fongicides est le moyen le plus couramment utilisé dans les systèmes de production intensive et de meilleurs rendements sont plus facilement atteints par la combinaison de pratiques culturales adéquates et l'utilisation de variétés résistantes à cette maladie (Eyal, 1999). Cependant, la spécificité du pathosystème *M. graminicola*-blé, fréquemment observée, peut interférer avec l'utilisation de variétés résistantes (Kema *et al.*, 1996 ; Kema et Van Silfhout, 1997 ; Kema *et al.*, 2000 ; Ware, 2006 ; Brading *et al.*, 2002 ; Rieger *et al.*, 2005 ; Saadaoui, 1987 ; Ronny *et al.*, 2014). Plusieurs hypothèses ont été émises sur l'interaction gène-pour-gène entre *Z. tritici* et le blé (Kema *et al.*, 2000 ; Brading *et al.*, 2002 ; Goodwin, 2007). Jusqu'à présent 18Stb gènes identifiés confèrent une résistance des cultivars à l'agent pathogène (Arraiano *et al.*, 2007 ; Goodwin, 2007 ; Chartrain *et al.*, 2009 ; Tabib Ghaffary *et al.*, 2011).

Une meilleure connaissance de la diversité génétique du pathogène ainsi que la contribution proportionnelle des deux types de reproduction (sexuée et asexuée) pourrait avoir un effet direct sur le développement de stratégies de lutte efficaces et durables contre cette maladie (Schnieder *et al.*, 2001 ; McDonald et Linde, 2002).

La diversité génétique des populations de *M. graminicola* a été largement étudiée en utilisant différentes tailles d'échantillon et une multitude de marqueurs moléculaires (Schnieder *et al.*, 2001 ; Linde *et al.*, 2002 ; Kabbage *et al.*, 2008 ; Komijani *et al.*, 2010 ; El Chartouni *et al.*, 2011).

Plusieurs populations de *M. graminicola* ont été étudiées dans le monde (Schneider *et al.* 2001 ; Linde *et al.*, 2002). Il a été montré que le centre d'origine du champignon se situe dans le croissant fertile (Linde *et al.*, 2002). Aussi, ces mêmes auteurs ont

montré, une grande diversité génétique à petite échelle et le flux de gènes a eu lieu à une fréquence élevée entre les régions, que ce soit à proximité ou entre continents (à grande échelle).

En Algérie, quelques travaux de recherche ont été entrepris concernant la virulence, la spécialisation parasitaire, l'existence des deux idiomorphes et l'héritabilité de la résistance du blé à *Z. tritici* (**Kema et al., 1996 ; Hattab-Touati, 2005 ; Benkorteby, 2006 ; Alloui et al., 2014 ; Ayad et al., 2014**).

Dans la perspective d'évaluer la diversité phénotypique et génotypique des populations de *M. graminicola* en Algérie recueillies à partir de champ de blés au niveau des régions céréalières, le présent travail de recherche regroupe différentes parties complémentaires. Ce qui peut fournir des données précieuses révélant le niveau de la dispersion et de la sévérité de la maladie, et soutiendrait la présence de la forme sexuée de l'agent pathogène. Ces informations sont nécessaires pour l'amélioration variétale et l'orientation des méthodes de lutte contre ce champignon afin d'atteindre les rendements souhaités en blés. Ce travail est consacré à une étude approfondie sur la septoriose du blé en Algérie et consistera à :

- Prospection et collecte d'échantillons de *Z. tritici* dans les zones céréalières nationales pour l'évaluation de la distribution et de la sévérité de la maladie ;
- Caractérisation morpho-culturelle des isolats de la région Est algérien ;
- Estimation de l'agressivité des isolats selon une gamme variétale constituée de variétés de plusieurs espèces hôtes (blé dur, blé tendre et triticales) ;
- Etude de la variabilité génétique d'une population d'isolats de la région Est par analyse de marqueurs microsatellites SSR (Simple Sequence Repeat) et la détermination des idiomorphes ;
- Recherche et caractérisation du téléomorphe *M. graminicola* ;
- Recherche de moyens de lutte contre cette maladie par une étude de l'effet de la fertilisation azotée et potassique sur l'évolution de la maladie en plein champ. Une approche de lutte chimique et biologique *in vitro* contre l'agent causal de la tache septorienne du blé est également abordée dans cette étude.

Synthèse bibliographique

1. Le blé dans le monde

Les céréales constituent de loin la ressource alimentaire la plus importante dans le monde à la fois pour la consommation humaine et pour l'alimentation du bétail. Le secteur des céréales est d'une importance cruciale pour les disponibilités alimentaires mondiales. La culture des céréales est fort ancienne en Algérie ; le blé et l'orge tiennent une place de premier ordre parmi les plantes cultivées (FAO, 2006).

Le blé est cultivé sur environ 10 millions d'hectares en Afrique. Il s'agit d'une culture de base majeure pour plusieurs pays et d'un produit importé dans toute l'Afrique. Dans l'ensemble des pays africains, la consommation de blé n'a cessé d'augmenter ces 20 dernières années en réaction à la croissance démographique, à l'évolution des préférences alimentaires et à l'évolution socioéconomique associée à l'urbanisation (Macauley et Ramadjita, 2015).

Il existe deux espèces de blé cultivées, le blé tendre (*Triticum aestivum* L.; $2n=6x=42$; AABBDD) et le blé dur (*Triticum turgidum* L., $2n=4x=28$; AABB). Selon les statistiques de la FAO (2016), le blé est globalement l'aliment le plus important des populations mondiales, se classant au troisième rang des 10 plus importantes cultures agricoles, avec une moyenne de production mondiale dépassant les 700 millions de tonnes sur une superficie récoltée avoisinant les 220 millions d'hectares durant l'année 2014, les trois pays les plus producteurs de blé dans le monde sont la Chine, l'Inde et les Etats Unis d'Amérique (Fig. 1). En Algérie, les superficies récoltées en 2014, pour cette culture, dépassent un million d'hectare avec une production aux alentours des trois millions de tonnes (Fig. 2)

L'ensemble des céréales ; maïs, riz et blé contribuent à l'alimentation de 47% de la population mondiale (Tweeten et Thompson, 2009). La contribution moyenne mondiale du blé en énergie alimentaire humaine est estimée à 524 Kcal/personne/jour en 2011. Les pays nord-africains ont la consommation de blé par tête la plus élevée et le blé fournit jusqu'à 50% de l'apport journalier en calories et en protéines (Macauley et Ramadjita, 2015). Les habitudes alimentaires du peuple algérien font que l'apport de cet aliment est important avec 1 424 Kcal/personne/jour selon les statistiques de la FAO pour l'année 2013.

Les pays africains sont les plus grands importateurs mondiaux de blé, avec plus de 45 millions de tonnes en 2013, ce qui représente environ 15 milliards USD.

Les importations de blé représentent 60% de la consommation africaine de blé (FAOSTAT, 2016 ; Macauley et Ramadjita, 2015).

Par conséquent, l'écart entre le rendement des agriculteurs et le rendement atteignable devrait être comblé de toute urgence pour accroître la production. La génération de cultivars présentant une résistance accrue au stress biotique et abiotique ainsi que des pratiques de gestion optimisées est actuellement considérée comme la meilleure stratégie pour atteindre cet objectif (Fischer et Edmeades, 2010).

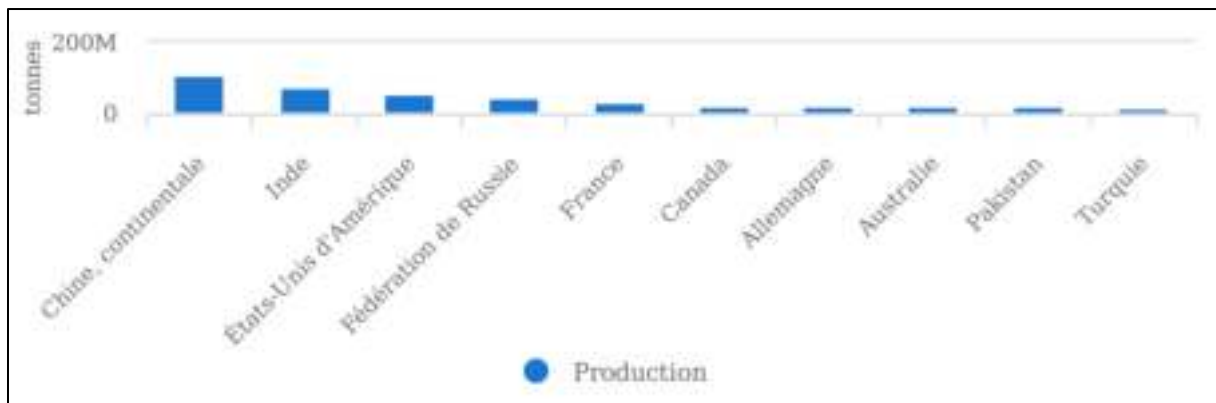


Figure 1 : Moyennes de production en blé pour les 10 principaux producteurs dans le monde entre 1994 et 2014 (FAOSTAT, 2016)

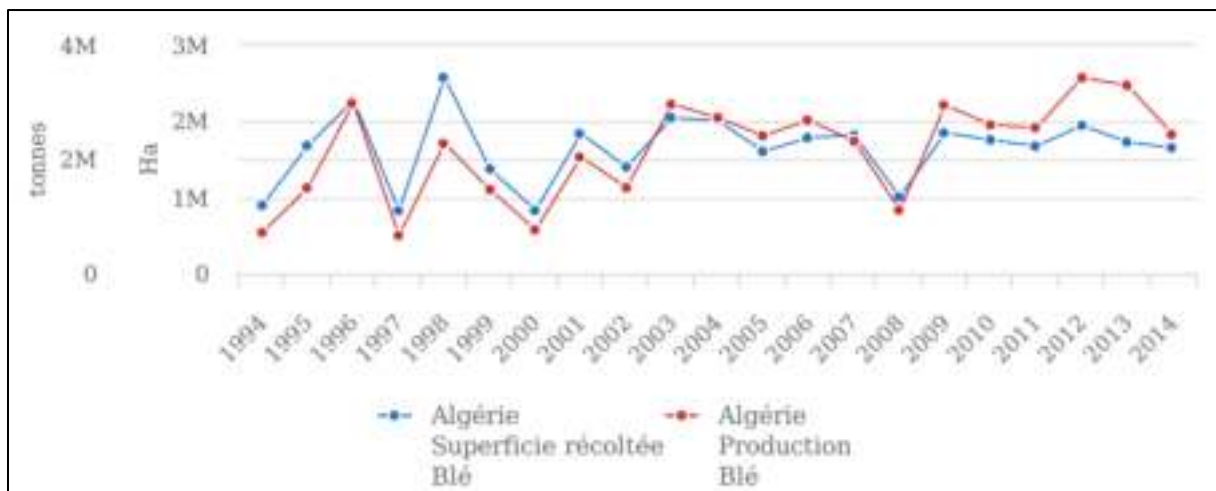


Figure 2 : Superficies récoltées et production de blé en Algérie entre 1994 et 2014 (FAOSTAT, 2016)

2. Présentation de la maladie

La septoriose (Septoria Leaf Blotch - SLB) est l'une des principales maladies foliaires du blé (*Triticum aestivum* et *Triticum durum*). Elle est causée par le champignon ascomycète connu sous les deux noms binomiaux *Mycosphaerella graminicola* (téléomorphe) et *Zymoseptoria tritici* (Quaedvlieg *et al.*, 2011), jusqu'à récemment l'anamorphe était dénommée *Septoria tritici*. La maladie est largement répandue dans le monde, notamment dans les régions où les conditions climatiques tempérées sont favorables au développement du champignon (Eyal *et al.*, 1987).

2.1. Taxonomie et nomenclature

Le genre *Mycosphaerella* ainsi que ses genres anamorphes associés comprend plus de 10 000 espèces. Ces dernières années, le genre *Mycosphaerella* est décrit à être polyphylétique, pas seulement inclus dans de nombreux genres au sein des *Mycosphaerellaceae* mais aussi au sein des *Dothideomycetes* (mycètes imparfaits) autrefois connus sous le nom de *Loculoascomycetes* (ascomycètes filamenteux) (Crous *et al.*, 2009 ; Eriksson et Winka, 1997), la plus large et diversifiée classe des ascomycètes, englobant 23 ordres et 110 familles (Wijayawardene *et al.*, 2014). Les espèces de ce genre causent des maladies sur une large gamme de cultures majeures, comme les céréales, les bananiers, le soja et un certain nombre d'arbres fruitiers (Farr *et al.*, 1995).

Récemment le genre *Zymoseptoria* est proposé comme nouveau genre de la famille des *Mycosphaerellaceae* (Tab.1) renfermant les espèces *Septoria*-like des *Poaceae* (Quaedvlieg *et al.*, 2011).

D'après Quaedvlieg *et al.* (2011), étymologiquement *Zymo* signifie yeast-like growth (croissance comme une levure) et *septoria* signifie *Septoria*-like in morphology (morphologiquement ressemble à *Septoria*).

Selon Quaedvlieg *et al.* (2011), les espèces de *Zymoseptoria* présentent une croissance semblable à celle d'une levure en culture (Yeast-like). Trois types de conidies peuvent être observés, le type I avec des conidies issues des pycnides, le type II possède des phragmospores sur mycélium aérien et le type III concerne les conidies proliférant sous forme de levure.

Tableau 1 : Classification de *Z. tritici* selon **Quaedvlieg et al. (2011)** et **Joint Genome Institute (2015)**

Classification	Appellation
Super-règne	<i>Eukaryota</i>
Règne	<i>Fungi</i>
Sous-règne	<i>Dikarya</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Sous-phylum	<i>Pezizomycotina</i>
Classe	<i>Dothideomycetes</i>
Sous-classe	<i>Dothideomycetidae</i>
Ordre	<i>Capnodiales</i>
Famille	<i>Mycosphaerellaceae</i>
Genre	<i>Zymoseptoria</i>
Espèce	<i>Zymoseptoria tritici</i>

La tache septorienne (SLB) est l'une des maladies les plus destructrices du blé dans le monde (**Fones et Gurr, 2015**) et au Maghreb (**Ezzahiri, 2001**). Elle a été décrite la première fois en Europe par **Desmazières (1842)**, plus tard par **Sprague (1934)** sur l'avoine dans le nord-ouest de l'Amérique du Nord (Nord-Ouest Pacifique). Selon **Quaedvlieg et al. (2011)**, l'agent causal est *Mycosphaerella graminicola* Fuckel (J. Schröt.), anamorphe *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvlieg et Crous, a été observé depuis 1894, mais le lien entre les deux formes était établi 80 ans après en Nouvelle-Zélande par **Sanderson (1972, 1976)**. Depuis le téléomorphe a été rapporté dans plusieurs pays : Australie (**Brown, 1975**), Chili (**Madariaga, 1986**), Royaume-Uni (**Scott et al., 1988**), États-Unis (**Garcia et Marshall, 1992**), Pays-Bas (**Kema et al., 1996**), France (**Halama, 1996**), Canada (**Hoorne et al., 2002**) et Tunisie (**Ben Hassine et Hamada, 2014**).

Z. tritici a émergé en parallèle avec la domestication de la culture du blé dans le croissant fertile il y a 10 000 à 11 000 ans (**Stukenbrock et al., 2007 ; 2011**).

2.2. Symptomatologie de la maladie

Les études rapportant que la maladie de la tache septorienne du blé dans le monde remontent à plusieurs années ; les symptômes de cette maladie sont décrits par **Weber (1922)**, **Shipton et al. (1971)**, **Weise (1977)**, **Zillinsky (1983)** et **Eyal et al. (1987)**.

Dans la plu part des cas, la maladie attaque les feuilles basales sous forme de petites lésions chlorotiques en automne ou au printemps (Pedersen, 1989 ; Ponomarenko, 2011), Les taches de couleur vert clair, puis jaune, deviennent brunes à leur périphérie, tandis que le centre se dessèche en raison de la mort des tissus ; les nécroses sont très souvent allongées, délimitées par les nervures et parsemées de très nombreuses fructifications sous forme de points noirs ou bruns appelés pycnides (Fig. 3-A et 3-B) (Rapilly *et al.*, 1971 ; Ponomarenko, 2011). Les pycnides peuvent être observées sur les deux faces du limbe (Eyal *et al.*, 1987).

Les nécroses apparaissent en moyenne entre 14 à 21 jours après l'inoculation du pathogène (Eyal *et al.*, 1987). La densité des pycnides dans les tissus infectés ainsi que la variabilité des variétés hôtes peuvent influencer les dimensions des pycnides (Razavi, 2003).

Le téléomorphe *M. graminicola* se forme sur les tissus morts du limbe et de la gaine de l'hôte (Pedersen, 1989). Selon Scott *et al.* (1988), les symptômes de la forme sexuée montrent des similitudes avec ceux de l'anamorphe *Z. tritici*, ce qui apprête à confusion (Fig. 3-A et 3-C).

2.3. Processus d'infection du pathogène

Le processus d'infection du pathogène *Z. tritici* a été étudié depuis les années 1990 (Sánchez-Vall *et al.*, 2015). Ce pathogène hémibiotrophe infecte des tissus foliaires vivants (feuilles vertes) en pénétrant par les stomates et peut survivre dans ces mêmes tissus morts ou en décomposition (chaumes et résidus) (Suffert *et al.*, 2013 ; Eyal, 1971).

Le cycle hétérothallique du champignon est conditionné par son système d'accouplement bipolaire résultant de la dispersion des pycnidiospores par éclaboussure de gouttelettes d'eau de pluie et des ascospores par le vent. Ces dernières représentent une source importante d'inoculum primaire, tandis que la propagation de la maladie pendant le cycle de culture est assurée par les pycnidiospores ; les deux formes de spores sont pathogènes (Ponamorenko *et al.*, 2011 ; Zhan *et al.*, 2007 ; McDonald et Linde, 2002 ; Eyal, 1999 ; Hunter *et al.*, 1999 ; Shaw et Royle 1989 ; Eyal *et al.*,1987).

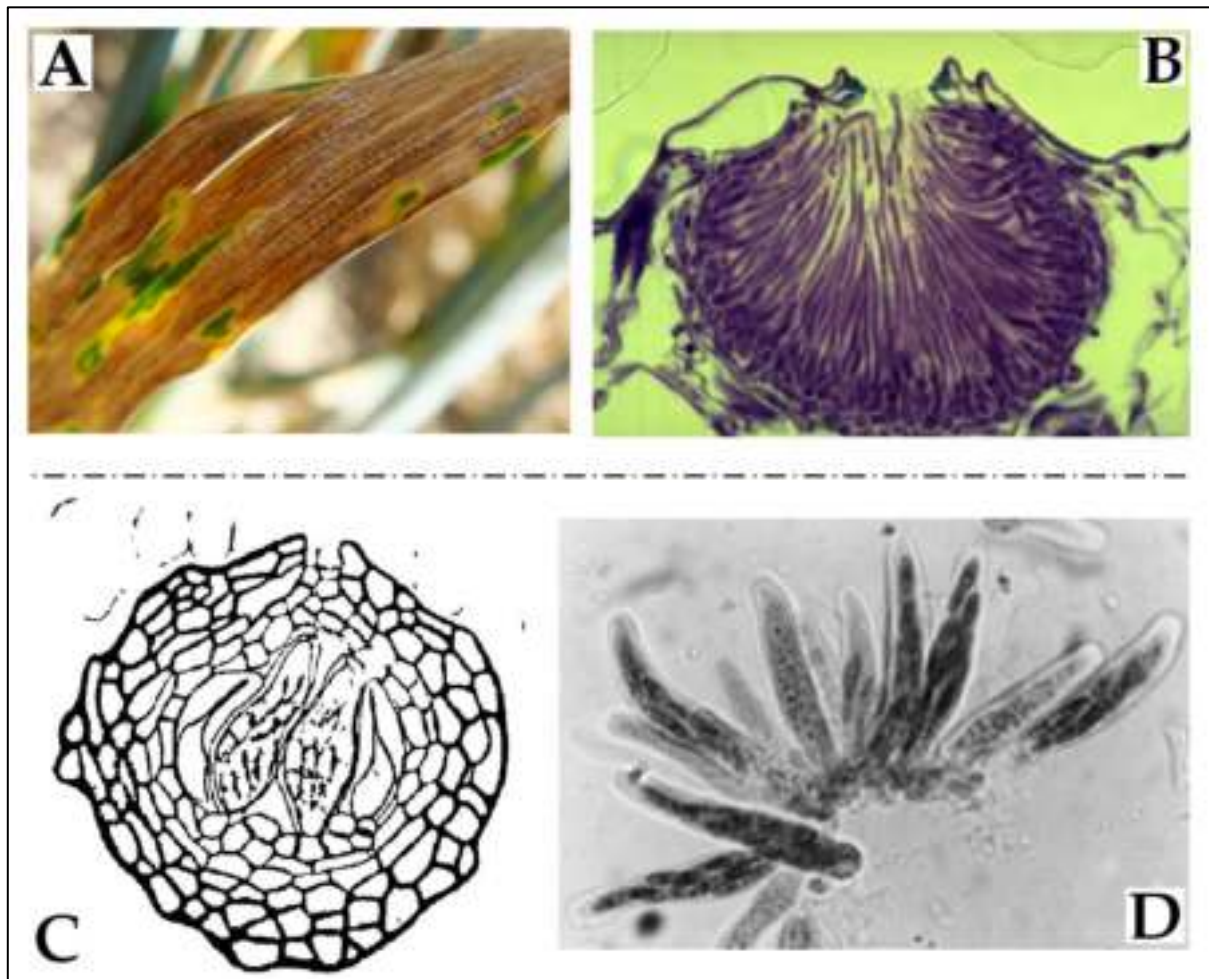


Figure 3 : Symptômes et aspects des fructifications de la maladie de la tache septorienne

A : Symptômes de la maladie. Feuille de blé montrant les symptômes typiques de la septoriose (Ponomarenko *et al.* 2011) ;

B : Pycnide de *Zymoseptoria tritici* (Kema *et al.*, 1996) ;

C : Pseudothèce de *Mycosphaerella graminicola* (Sanderson, 1976) ;

D. Asques contenant des ascospores de *M. graminicola* (Halama, 1996).

L'infection se fait selon trois principales étapes (Fig. 4) s'initiant par la pénétration du champignon dans le tissu végétal suivi de la colonisation de ce dernier et s'achève par formation de fructifications (**Hilu et Bever, 1957; Eyal et al., 1987 ; Shipton et al., 1971 ; Suffert et al., 2011**).

2.3.1. Pénétration du champignon

Le tube germinatif se développe aléatoirement sur la feuille et la pénétration se fait préférentiellement par les stomates ouverts ou fermés (**Cohen et Eyal, 1993 ; Hilu et Bever, 1957**). Plusieurs études morphologiques indiquent la présence d'un gonflement à la pointe du tube germinatif semblable à un appressorium (**Duncan et Howard, 2000 ; Kema et al., 1996a ; Cohen et Eyal, 1993**).

2.3.2. Colonisation du tissu végétal

Une fois à l'intérieur des tissus de la feuille, les mycéliums apparaissent après 12 à 24 jours dans la cavité substomatale (**Duncan et Howard, 2000 ; Kema et al., 1996a ; Hilu et Bever, 1957**), le champignon colonise les tissus intercellulaires du mésophylle, sans former des haustoria (**Palmer et Skinner, 2002**). La majorité des hyphes se développent tout au long des nervures du limbe et restent exclusivement dans l'espace intercellulaire du tissu végétal (**Hilu et Bever, 1957 ; Kema et al., 1996a**). Dans les premiers 9 à 15 jours, ils forment un réseau ramifié qui colonise le mésophylle de la feuille (**Shetty et al., 2003**). Environ 3 à 11 jours après l'infection, les mycéliums remplissent l'espace substomatal et des pycnides apparaissent dans les cavités (**Shetty et al., 2003 ; Duncan et Howard, 2000 ; Cohen et Eyal, 1993**). Durant cette période, l'infection reste asymptomatique. Les feuilles sont d'apparence saines et les tissus morts sont rarement aperçus (**Hilu et Bever, 1957**). C'est la phase de latence (phase biotrophe), qui varie entre 6 et 36 jours (**Shipton et al., 1971**), en fonction de la combinaison génotype du blé et de l'isolat (**Lee et al., 2014**) et aussi des conditions climatiques (**Shetty et al., 2007 ; Kema et al., 1996b**).

Kema et al. (1996c) ont constaté que le mycélium pousse abondamment chez les cultivars sensibles, tandis que la colonisation est limitée chez les cultivars résistants. Ils ont noté aussi une condensation des chloroplastes suivie d'un gonflement cellulaire intense chez les variétés sensibles, ce qui est considéré comme une réponse aux composés solubles produits par le champignon. Aussi, des granules d'amidons sont libérées à partir du chloroplaste, dont le rôle peut être une réponse de la plante pour limiter la colonisation par le champignon.

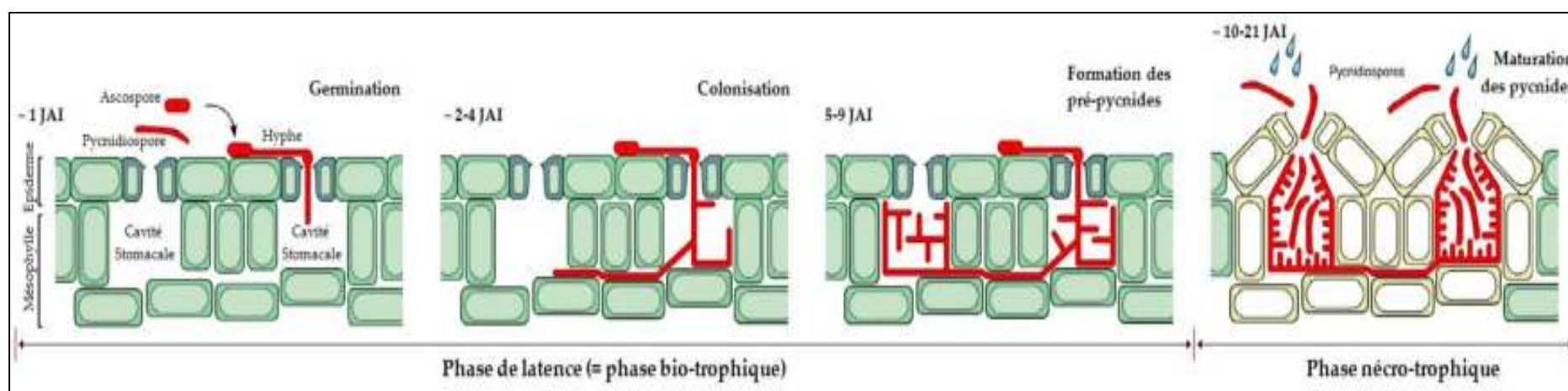


Figure 4 : Etapes de l'infection du tissu végétale par *Z. tritici* (Steinberg, 2015).
(JAI : Jour après infection)

Des études sur le processus d'établissement de la phase de latence montrent la nécessité du LysM-motif qui contient des protéines effectrices Zt3LysM (Lee *et al.*, 2014 ; Marshall *et al.*, 2011). Ces effecteurs interagissent avec des récepteurs de chitine, inducteurs indispensables de la défense de la plante, sont libérés de la paroi cellulaire des champignons (Sanchez-Vallet *et al.*, 2013). La protéine protège également la paroi des cellules fongiques des enzymes hydrolytiques d'origine végétale (Lee *et al.*, 2014).

2.3.3. Formation des fructifications

La formation des pycnides est initiée dans la cavité substomatale (Shetty *et al.*, 2003 ; Kema *et al.*, 1996a). Elles sont formées par croissance extensive, ramification et fusion des hyphes (Hilu et Bever, 1957). Généralement, les nécroses apparaissent 10 à 12 jours après l'infection (Duncan et Howard, 2000 ; Kema *et al.*, 1996a). Cette phase nécrotrophe se caractérise par une désintégration des tissus de l'hôte qui peut être la conséquence d'une mort cellulaire programmée (Rudd *et al.*, 2008 ; Keon *et al.*, 2007).

Les pycnides matures produisent des pycnidiospores pluricellulaires qui se développent à partir des conidiophores (Kema *et al.*, 1996a ; Hilu et Bever, 1957). Ces fructifications possèdent des dimensions variables de l'ordre de 60 à 200 μm . Les pycnidiospores hyalines, étroites, courbes et filiformes peuvent être présentes sous deux formes à l'intérieur de la pycnide : les macropycnidiospores (35 à 98 \times 1 à 3 μm), présentent 3 à 5 cloisons et les micropycnidiospores unicellulaires (8 à 10,5 \times 0,8 à 1 μm). Ces deux formes sont capables d'infecter le blé (Scharen, 1999 ; Eyal *et al.*, 1987 ; Sanderson *et al.*, 1985 ; Shipton *et al.*, 1971). Une variation morphologique considérable est notée au niveau des différents champs (Steinberg, 2015).

La forme sexuée *M. graminicola*, développe des pseudothèces sous épidermiques, globuleux, de couleur brun foncé avec un diamètre de 70-100 μm . Eriksen et Munk (2003) ont établi que les pseudothèces contiennent 19 à 45 asques (moyenne de 26). A maturité, chaque asque contient 8 ascospores, hyalines, elliptiques, bicellulaires (10-15 \times 2-3 μm) et disposées irrégulièrement à l'intérieur de l'asque (Sanderson, 1976 ; Eyal *et al.*, 1987). Quand les ascospores sont stockées à l'obscurité, ils survivent pendant 1 à 2 semaines, mais exposés à la lumière du jour, ils ont une durée de vie ne dépassant pas les 2 jours (Brown *et al.*, 1978). Sous conditions favorables, les ascospores peuvent être projetées à de longues distances.

2.3.4. Epidémiologie de la maladie

Les résidus, de cultures infectées, sont une importante source d'inoculum primaire. Les pycnidiospores survivent dans les pycnides sur les chaumes infectés pendant plusieurs mois. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle important des ascospores comme source d'inoculum primaire (Sanderson et Hampton 1978 ; Suffert, 2011) (Fig. 5).

Le rôle des ascospores comme source principale d'inoculum primaire a été montré en utilisant des jeunes plantes de blé comme piège biologique ; les jeunes plantes placées en plein champ dont le précédent cultural était le blé, exposé ainsi à l'inoculum local, ont montré une sévérité beaucoup plus importante de SLB que les plantes protégées contre l'inoculum aéroporté (Shaw et Royle, 1989).

Des études indiquent l'existence de 26 adventices et graminées cultivées identifiées comme hôte de *M. graminicola*. Toutefois, seulement six études ont montré le rôle des graminées dans l'épidémiologie de SLB (Weber, 1922 ; Sprague, 1944 ; Williams et Jones, 1973 ; Brokenshire, 1975 ; Ao et Griffiths, 1976 ; Haghdel et Banihashemi, 2005). Six espèces sensibles au SLB (*Agrostis commun*, *Bromus hordeaceus subsp.*, *Anisantha sterilis*, *Festuca arundinacea*, *Poa annua* et *P. pratensis*) ont été signalées dans au moins deux études indépendantes et peuvent donc être considérées hôtes alternatifs du pathogène (Suffert *et al.*, 2011).

Les pycnidiospores sont la source la plus commune de l'inoculum secondaire et peuvent rester viables pendant plusieurs mois à des températures comprises entre 15 et 20°C (Wiese, 1987). Le cirrhe, dans lequel les pycnidiospores sont libérées, les protège du rayonnement et de la dessiccation et stimule leur germination. Les spores produits pendant les périodes humides sont disséminées par la pluie à partir des débris ou des feuilles inférieures d'une culture aux étages foliaires supérieurs (transport vertical) ou les plants environnants (transport horizontal) (Fig. 5). Ce dernier mode de transport peut également se produire en l'absence d'éclaboussures des gouttelettes de pluie par contact avec la feuille (Royle *et al.*, 1995).

Par ailleurs, le transport vertical des pycnidiospores par la pluie est affecté par la structure du couvert végétal (distance entre les feuilles, la longueur des limbes et de la posture) (Eyal, 1999).

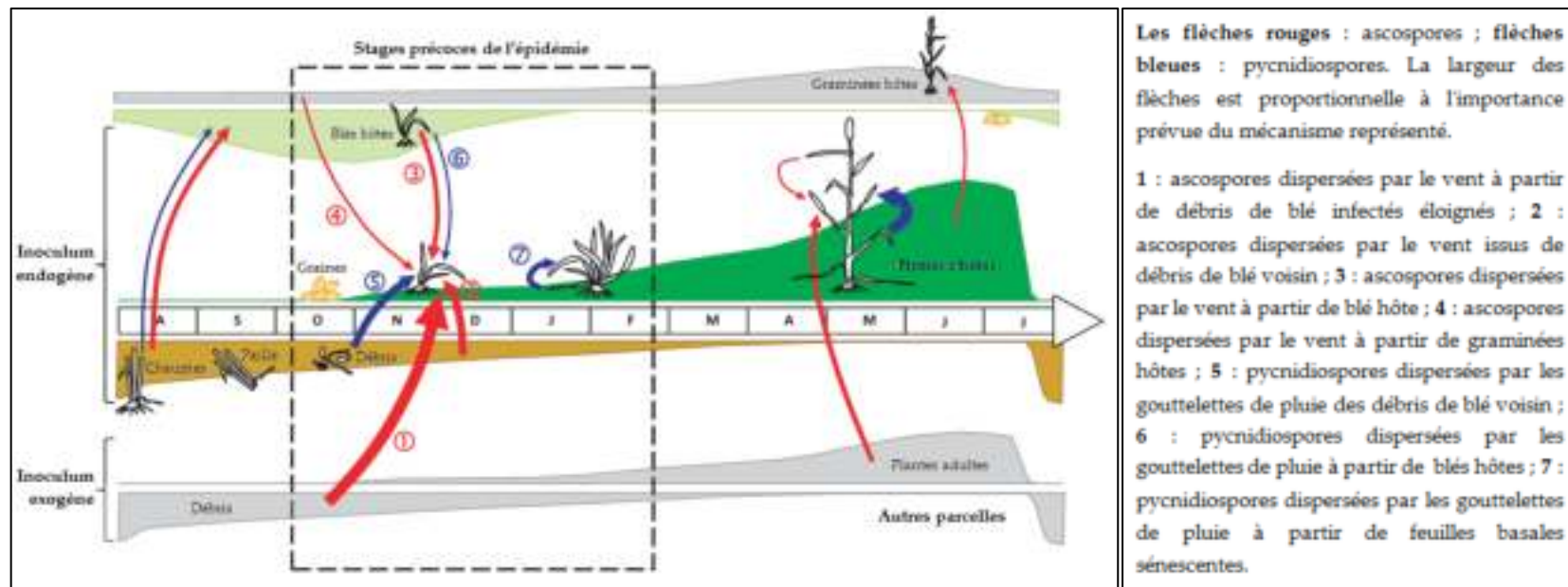


Figure 5 : Dynamique annuelle de *Zymoseptoria tritici* agent causale de la tache septorienne du blé (Suffert *et al.*, 2011)

Dans les pays caractérisés par un climat méditerranéen, la pluie est considérée comme le facteur limitant de l'épidémie (Eyal, 1971). De longs intervalles sans pluie peuvent limiter la propagation à la fois horizontale et verticale de la maladie (Eyal *et al.*, 1987).

La température optimale pour le développement de la tache septorienne est située entre 15 et 20°C (Wiese, 1987). Le deuxième facteur important pour le développement de la maladie est l'humidité (Shaner et Finney, 1976). Une humidité suffisante pendant 24 à 96 h favorise la sévérité de la maladie sur la feuille drapeau (Hess et Shaner, 1987).

3. Spécialisation physiologique

L'existence d'une spécialisation physiologique entre *Z. tritici* et le blé tendre a été rapportée par Eyal *et al.* (1973) et ont noté que la réponse de l'hôte est quantitative (le pourcentage de nécroses et le taux du recouvrement pycnidial) dans le pathosystème blé - *Z. tritici*. Par la suite, plusieurs auteurs ont confirmé ces résultats sur de jeunes plants (Abrinbana *et al.*, 2012 ; Czembor *et al.*, 2011 ; Medini et Hamza, 2008 ; Arraiano et Brown, 2006 ; Grieger *et al.*, 2005 ; Ahmed *et al.*, 1995 ; Chartrain *et al.*, 2004 ; Arraiano *et al.*, 2001a ; Kema *et al.*, 1996a) et sur plantes adultes (Grieger *et al.*, 2005 ; Brown *et al.*, 2001 ; Ezrati *et al.*, 1997 ; Kema et Van Silfhout, 1997 ; Danon et Eyal, 1990).

Dans les pays où les variétés de blé dur prédominent, la population de pathogènes est essentiellement constituée d'individus dont la virulence est adaptée aux blés durs. Cependant, ces populations peuvent aussi contenir des adaptations au blé tendre ou une adaptation aux deux espèces de blé (Ayad *et al.*, 2014 ; Hattab-Touati, 2005 ; Kema *et al.*, 1996a ; Jlibene *et al.*, 1995 ; Saadaoui, 1987 ; Eyal *et al.*, 1985).

La spécificité chez les plantes adultes a été montrée par inoculation en plein champ avec des isolats spécifiques préalablement testés sur jeunes plants (Kema et Van Silfhout, 1997 ; Danon et Eyal, 1990).

La présence d'une interaction gène-pour-gène dans le pathosystème blé - *Z. tritici* a été déduite à partir d'analyse statistique de la variance de l'interaction (variété-isolat) selon le paramètre recouvrement pycnidial (Kema *et al.*, 1996 ; Eyal *et al.*, 1985) ; ce comportement a été montré par la résistance du cultivar Stb6 à l'isolat IPO323

(**Brading et al., 2002 ; Kema et al., 2000**). L'adaptation des isolats aux deux espèces de blé, implique l'intervention du locus d'avirulence AvrStb6 correspondant à Stb6 (**Brading et al., 2002**). Cela suggère que la résistance du blé à des formes adaptées de *Z. tritici*, peut-être, en partie contrôlée par les gènes de résistance qualitatifs (**Ware, 2006**).

Récemment, **Kellner et al. (2014)** ont identifié des déterminants de la spécificité de l'hôte vis-à-vis de *Z. tritici* en utilisant des profils de transcription de deux graminées (blé, l'hôte compatible, et *Brachypodium distachyon*, hôte non compatible sur lequel le champignon est deux fois moins virulent) à un stade précoce d'infection. Ils ont développé une nouvelle procédure pour l'analyse des séquences d'ARN de *Z. tritici* collectés *in planta* pour mieux comprendre le fonctionnement des gènes.

Les résultats obtenus par **Kellner et al. (2014)** révèlent l'existence de systèmes régulateurs de l'infection communs aux deux hôtes ainsi que des gènes d'expression spécifique au blé. Le système d'infection spécifique au blé, constitué de deux groupes de gènes co-régulés, représente les îlots candidats de pathogénicité. Les mêmes auteurs expliquent que les analyses phylogénétiques suggèrent que les événements de duplication génique sur les chromosomes accessoires sont rares et largement précédés de la diversification des espèces de *Zymoseptoria*.

4. Variabilité génétique de *M. graminicola*

En phytopathologie, l'identification précoce de l'agent causal de la maladie et la connaissance de la structure génétique des populations du phytopathogène est primordiale afin de mettre en œuvre des stratégies de contrôle efficaces (**Atkins et Clark, 2004**).

La génétique des populations est l'étude de la structure des populations et des processus évolutifs qui façonnent ces caractères structurels. « La structure génétique des populations » se réfère à l'importance et à la distribution de la variation génétique au sein des populations de pathogènes. La définition de cette structure est une première étape logique dans les études génétiques des populations. Les processus de l'évolution comportent les mutations, les flux de gènes, la recombinaison, la sélection et la dérive (**Carbone et Kohn, 2004**).

La plupart des questions en génétique des populations peuvent être résolues en utilisant les marqueurs génétiques qui sont sélectivement neutres, très instructifs, reproductibles et relativement faciles à l'essai (**McDonald, 1997**).

Les progrès de la biologie moléculaire au cours des dernières décennies ont permis d'identifier différents types de marqueurs protéiques ou à base d'ADN pour la caractérisation des populations de pathogènes. Ces techniques, citées par **Tsedaley (2015)** et **Setti et al. (2011)** comprennent l'analyse des isozymes, l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD), polymorphisme de longueur des fragments amplifiés ou de restriction (RFLP ou AFLP) de l'ADN nucléaire ou mitochondrial, empreintes génétiques, caryotypes électrophorétiques, microsatellites ou SSR (simple sequence repeat polymorphism) et les SNP (single nucleotide polymorphism).

Suite à des analyses moléculaires effectuées sur du soja, **Powell et al. (1996)** ont rapporté que les SSR ont une plus grande efficacité de détecter une variation intraspécifique en comparaison avec les autres marqueurs génétiques comme la RFLP, l'AFLP et la RAPD ; les marqueurs SSR ont révélé l'hétérozygotie la plus élevée.

Les microsatellites, aussi connus comme simple séquence répétées (SSR) ou de courtes répétitions en tandem (STR) sont constitués d'unités répétées en tandem de Mono-, Di-, Tri- ou Tétranucléotides de longueur variable (**Tautz, 1989 ; Guichoux, 2011**). Les SSRs sont largement dispersés dans les génomes des eucaryotes et notamment ceux des champignons (**Hamada et al., 1982 ; Rosewich et McDonald, 1994**).

Owen et al. (1998) ont isolé et caractérisé neuf single-locus comme marqueurs microsatellites de *M. graminicola*. Ils ont également développé des amorces spécifiques pour les régions adjacentes de ces loci. Ces amorces sont utilisées pour étudier la diversité génétique parmi les isolats de l'agent pathogène. D'autres amorces microsatellites Di-, Tri-, et Tétranucléotides ont été caractérisées et sont adaptés à l'étude de la diversité génotypique du *Fusarium* et de *M. graminicola* (**Bahkali et al., 2012**).

Récemment un protocole fiable relatif à l'amplification de 24 SSRs organisé en trois panneaux multiplex, et couvrant tous les chromosomes de *Z. tritici* est mis en évidence. La procédure permet aussi l'attribution automatique des allèles en les

marquant d'une manière reproductible. Cette stratégie peut fournir des informations génétiques utiles pour les inférences évolutives concernant les populations du pathogène. De plus, il facilitera la comparaison entre différentes études (**Gautier et al., 2014**).

Waalwijk et al. (2002) ont réussi à isoler et caractériser les deux idiomorphes de *M. graminicola* en développant une méthode de PCR multiplex pour déterminer les fréquences des allèles dans les populations naturelles. Cela a permis de déterminer l'impact des recombinaisons issues de la reproduction sexuée sur la dynamique du pathogène. Plusieurs études réalisées sur des isolats collectés sur les cinq continents ont montré que les deux idiomorphes sont à fréquence égale selon des échelles spatiales allant de quelques mètres carrés à plusieurs milliers de kilomètres carrés (**Allioui et al., 2014 ; Elbekali et al., 2012 ; Siah et al., 2010 ; Zhan et al., 2002**).

A titre d'exemple, la structure génétique des populations de *M. graminicola* du Kansas (USA) a été évaluée à différentes échelles spatiales en utilisant l'AFLP (**Kabbage et al., 2008**). 42 isolats de *M. graminicola*, collectés en Tunisie, Algérie et l'Ouest du Canada ont été caractérisés par une RFLP à sept paires d'amorces. L'analyse des données a révélé que la diversité génétique au sein des populations représente 87,5% (**Medini et Hamza, 2008**).

En France, la diversité génétique a été examinée avec des marqueurs microsatellites et une analyse PCR-SSCP de deux séquences codantes (actine et b-tubuline). Un total de 363 isolats ont été échantillonnés à partir 17 provinces. Les haplotypes uniques représentent 84% des populations, la diversité génétique est évaluée à l'échelle nationale et locale. Les résultats de cette étude ont mis en évidence le potentiel d'adaptation du champignon aux conditions locales (**El Chartouni et al., 2011**).

Goodwin et al. (2011) ont réalisé une analyse sur 330 isolats de *Z. tritici*, représentant 11 populations dans l'Indiana et le Kansas (USA) pour étudier la variabilité génétique par le biais de 17 marqueurs microsatellites (SSR). Au total, 306 haplotypes ont été détectés. Des niveaux élevés de diversité génétique ont été enregistrés.

Berraies et al. (2013) ont choisi sept marqueurs microsatellites pour évaluer la diversité génétique des *M. graminicola* en Tunisie. Un niveau élevé de diversité génétique a été observé et varie de 0,403 à 0,555 avec une moyenne de 0,484.

5. Méthodes de lutte

La tache septorienne du blé considérée comme l'une des principales maladies fongiques en raison de son impact sur la gestion des cultures et la production. L'agent pathogène, *Z. tritici*, est adapté aux climats de type méditerranéen, soit des hivers humides avec des températures modérées. Dans les conditions optimales, de graves épidémies peuvent engendrer des pertes atteignant les 50% sur les variétés de blé sensibles à cette maladie (Eyal *et al.*, 1987 ; Fones et Gurr, 2015) .

5.1. Utilisation de variétés résistantes

L'utilisation de variétés résistantes est le meilleur moyen pour lutter contre la tache septorienne du blé. *Z. tritici* a été une cible majeure pour les sélectionneurs de blé depuis sa prévalence (Torriani *et al.*, 2015).

Le développement de la maladie peut être conditionné par les caractéristiques du végétal en limitant la dispersion de l'inoculum par éclaboussure des gouttelettes d'eau aux étages supérieurs (Arraiano *et al.*, 2009). Cependant, ces caractères peuvent être inadaptés aux caractères agronomiques recherchés, dont les rendements (Brown *et al.*, 2015).

Brown *et al.* (2015) ont fait une synthèse sur les progrès actuels réalisés dans la connaissance des gènes de résistance à la tache septorienne du blé. Ces gènes peuvent être groupés en deux classes, bien que quelques-uns puissent avoir les caractéristiques des deux classes. La résistance qualitative est conditionnée par les gènes qui contrôlent les grandes fractions de variation génétique, 21 gènes ont été découverts (Wilson, 1985 ; Somasco *et al.*, 1996 ; Arraiano *et al.*, 2001 ; Tabib Ghaffary *et al.*, 2012 ; Chartrain *et al.*, 2005). Il a été montré que le gène *Stb6* contrôle la relation gène-pour-gène (Arraiano *et al.*, 2009). La plupart des résistances qualitatives sont peu susceptibles d'être durables et certains gènes autrefois efficaces ont été surmontés par l'évolution de la virulence du pathogène. Un autre gène d'intérêt particulier est le *Stb16q*, qui est le plus efficace contre tous les isolats de *Z. tritici* testés à ce jour (Tabib Ghaffary *et al.*, 2012).

La résistance quantitative est généralement contrôlée par des gènes de faible effet à modéré sur le SLB. Ils possèdent une spécificité généralement plus faible que les gènes qualitatifs et confèrent une résistance plus durable. 89 régions du génome

portant des caractères quantitatifs (QTL) ou méta-QTL ont été identifiées à ce jour (**Tabib Ghaffary et al., 2011**).

La possibilité que le pathogène surmonte la résistance des variétés existantes actuellement est élevée, en raison de l'évolution rapide et de la diversité du pathogène par rapport à l'évolution de la sélection génétique des blés. Par conséquent, le contrôle de *M. graminicola* repose encore fortement sur l'utilisation des fongicides (**Thygesen et al., 2008**).

5.2. Pratiques culturales

La lutte contre SLB inclut l'introduction d'un système de rotation des cultures ou l'élimination des débris contaminés par *M. graminicola* en brûlant les débris ou par le labour pour réduire le nombre d'ascospores susceptibles d'infecter la nouvelle culture (**Murray et al., 1998**).

Les labours servent à enfouir profondément les débris végétaux dans le but de détruire les plantes-hôtes contaminées ; en revanche les pratiques culturales simplifiées favorisent la prolifération de la maladie. La fertilisation excessive notamment la fertilisation azotée (tallage abondant) est favorable au développement de la maladie (**Maloy et Inglis, 1993**).

Afin de réduire la quantité d'inoculum, la rotation en utilisant des cultures non-hôtes ne doit pas inclure de graminées pendant 3 à 4 ans ce qui permet la décomposition des résidus infectés. De même, la pratique des semis tardifs aide à réduire les attaques d'automne (**Krupinsky, 1999 ; Ponomarenko et al., 2011**).

Selon **Bannon et Cooke (1998)** en plus de la rotation, les cultures intercalaires peuvent être efficaces pour réduire l'inoculum. Ils ont noté que la dispersion des pycnidiospores a été réduite de 33% horizontalement et de 63% verticalement au niveau du système blé-trèfle. Aussi, l'utilisation d'un mélange de cultivars sensibles et d'autres modérément résistants, réduit la progression de la maladie (**Mundt et al., 1999**).

5.3. Lutte chimique

Les fongicides sont couramment utilisés par les agriculteurs dans le monde. Le volume estimé de produits agrochimiques utilisés en Europe pour lutter contre la tache septorienne est d'environ 70% du volume total utilisé pour le contrôle de l'ensemble des maladies fongiques des céréales (**Ponomarenko et al., 2011**). Il existe trois groupes de fongicides généralement utilisés dans la lutte contre les maladies fongiques des céréales : les fongicides QoI (Azoxystrobin, Pyraclostrobin et Trifloxystrobin) généralement connus sous le nom des strobilurines ; ils bloquent le transfert d'électron dans la chaîne respiratoire (**Sierotzki, 2007**). Les DMIs (epoxiconazole, cyproconazole et prothioconazole) sont apparus au cours des années 1970, souvent connus comme le groupe des triazoles et des azoles. Ils ciblent la biosynthèse des stérols par l'inhibition des enzymes 14- α -steroldemethylase codés par le gène CYP51 (**Siegel, 1981**). Récemment des inhibiteurs de succinate déshydrogénase ou SDHIS (Boscalid), fongicides à large spectre ont été introduits (**Sierotzki et Scalliet, 2013**).

Les traitements de semences sont couramment utilisés dans le but de lutter contre l'inoculum sous forme d'ascospores apportés par l'air sur jeunes plants durant l'automne. Néanmoins, ces traitements ne peuvent pas prévenir les épidémies sévères pendant la période végétative au printemps (**Lucas et al., 1999**).

Le moment de l'application du fongicide est problématique, la pulvérisation au début de l'infection est efficace selon la période de latence (14-28 jours). En effet, les feuilles ne montrent pas de symptômes mais le pathogène prolifère. La bonne pratique est que le fongicide doit être pulvérisé avant que la maladie n'apparaisse, afin de protéger le développement du feuillage, et surtout la feuille drapeau au stade épiaison (**Anonyme AHDB, 2015**). Cependant, si les lésions commencent à apparaître, le pathogène est installé et l'application de fongicide est d'une utilité limitée (**Fones et Gurr, 2015**). Selon **Cook et al. (1999)** et **Marroni et al. (2006)**, les pertes de rendement causées par la maladie peuvent se produire à partir du stade trois feuilles (SG32).

Il existe peu de fongicides possédant la faculté d'être curatifs et de prévenir la colonisation des tissus de l'hôte par le pathogène en limitant la progression des hyphes. Une fois les pycnides apparus, il n'existe pas de fongicides capables de

stopper la maladie. Ces fongicides (en particulier, les azoles) sont ceux pour lesquels la résistance du pathogène se développe (Lucas *et al.*, 1999 ; Fones et Gurr, 2015).

Plusieurs études effectuées au champ et au laboratoire ont montré que *Z. tritici* a développé une résistance aux trois groupes de pesticides existants (Skinner *et al.*, 1998 ; Fraaije *et al.*, 2005 ; Cools *et al.*, 2005).

La résistance au champ aux QoIs est conférée par une mutation au niveau du gène cytochrome b, cela empêche le fongicide de se lier au site Qo et restaurer la capacité du champignon à effectuer la respiration microbienne (Fraaije *et al.*, 2005). Le mécanisme de résistance des DMIs est polygénique composé de trois principaux mécanismes qui sont des mutations au niveau du gène CYP51 ; ces dernières peuvent se combiner pour déterminer le niveau de résistance. Ce qui explique le développement progressif de la résistance vis-à-vis des DMIs par rapport aux QoIs (Cools et Fraaije, 2013). En ce qui concerne le groupe SDHI, des isolats de *Z. tritici* avec les mutations nécessaires dans les gènes codant pour la succinate déshydrogénase mitochondriale (SDH) ont été repérés, mais la fréquence de ces mutations semble trop faible pour affecter les performances des fongicides sur le terrain (Sieratzki, 2013).

5.4. Lutte biologique

Récemment, les chercheurs se sont intéressés aux micro-organismes antagonistes pour lutter contre les maladies fongiques des cultures, à cause des problèmes engendrés par l'utilisation excessive des fongicides. Perello *et al.* (2008) ont mis en évidence la fiabilité de deux espèces de *Trichoderma* en condition de plein champ, afin de contrôler l'agent responsable du SLB. Plusieurs bactéries collectées au niveau de la rhizosphère des cultures de blé infestées de *Z. tritici* ont été isolées ; le pouvoir inhibiteur de trois souches bactériennes, deux *Pseudomonas fluorescens* et un *Bacillus megaterium*, est mis en évidence en plein champ sur des cultures de blé à différents stades phénologiques (Kildea *et al.*, 2008).

Matériel et méthodes

1. Prévalence de la septoriose en Algérie

1.1. Régions et périodes des prospections

Au cours des périodes avril-mai des années 2010, 2011 et 2013 des prospections sont réalisées au niveau de différentes régions céréalières du pays (Fig. 6). Durant la campagne 2010, les prospections ont eu lieu à l'Ouest et quelques localités de la zone Est. En 2011, elles sont généralisées à la région Centre et quelques localités de la région Ouest. En 2013 les prospections ont été consacrées particulièrement à la région Est.

1.2. Méthode d'échantillonnage

Les prospections ont été réalisées aux stades phénologiques des blés s'étalant de la floraison à la maturité. Au cours de ces prospections, des notations et prélèvements le long des axes routiers ont été effectués régulièrement, tous les 15 à 20 km, à travers les régions céréalières.

Pour chaque champ de blé, l'inspection se fait en diagonales en partant des extrémités vers le centre du champ selon l'approche d'échantillonnage X-shaped de **Campbell et Madden (1990)** (Fig. 7).

1.3. Diagnostic et quantification de la maladie au champ

Le diagnostic sur les cultures de blé est basé sur l'observation du symptôme typique de la maladie causée par *Z. tritici*. La tache septorienne s'identifie par des nécroses allongées et délimitées par les nervures (**Duncan et Howard, 2000 ; Sayoud et al., 1999**). Les nécroses sont très souvent allongées et parsemées de très nombreuses pycnides (**Rapilly et al., 1971**).

En cas de présence de symptômes typiques de la maladie, L'estimation est réalisée sur 10 pieds par mètre carré prélevé, selon l'échelle Double digit (00-99) décrite par **Eyal et al. (1987)** ; le premier chiffre représente la progression verticale de la maladie selon l'échelle 0-9 de **Saari et prescott (1975)**. Le deuxième chiffre indique la sévérité de la maladie selon une échelle 0-9 dont chaque chiffre correspond à un pourcentage de couverture de la surface foliaire par la maladie (Fig. 8).

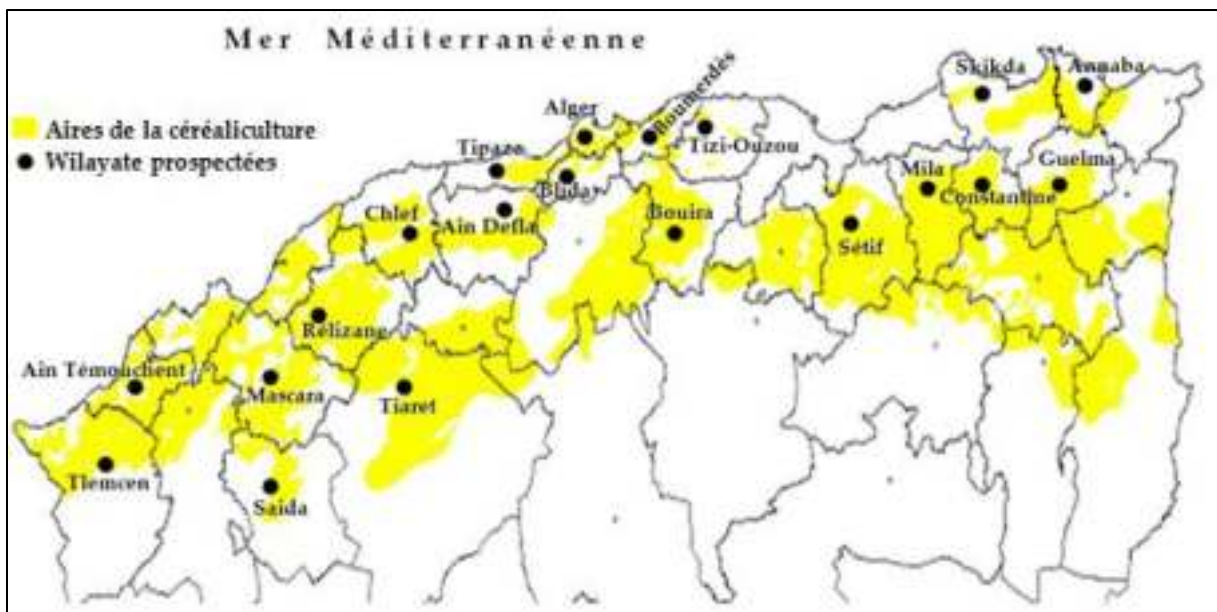


Figure 6 : Zones à vocation céréalière (Source : Ministère de l’agriculture) et Wilayate prospectées pour la maladie de la tache septorienne en Algérie

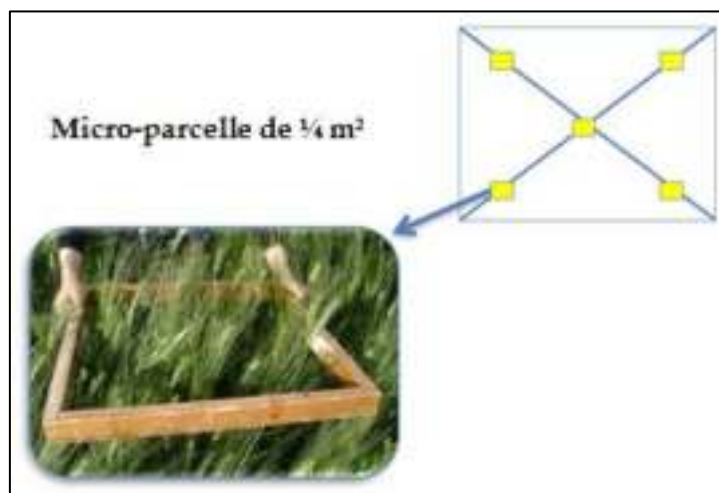


Figure 7 : Méthode d’échantillonnage X-shaped de **Campbell et Madden (1990)**.

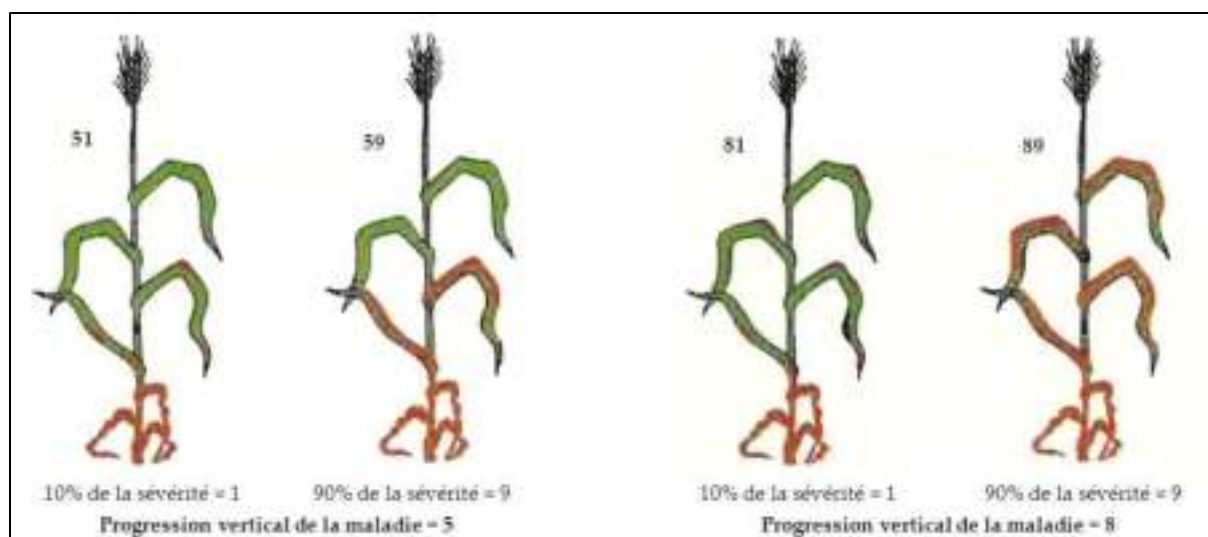


Figure 8 : Echelle Double Digit (00-99) décrite par Eyal (1987)

2. Isolement et caractérisation morpho-culturelle

L'identification de la maladie et les isollements sont réalisés à partir de petits fragments de limbes présentant des pycnides caractéristiques. Les fragments sont découpés et désinfectés par une solution d'hypochlorite de sodium à 2% pendant 5 min, ensuite, rincés par 3 bains d'eau distillée stérile pendant 2 à 3 min chacun. Ces fragments sont déposés aseptiquement sur papier buvard imbibés avec de l'eau distillée stérile, dans des boîtes de Pétri. Les boîtes sont incubées pendant 24 heures à une température de 18 à 20°C et une lumière continue. Les pycnides laissent exsuder une gelée sporifère de couleur blanc-crème qui constitue le cirrhe contenant des pycnidiospores. Le cirrhe d'une seule pycnide est prélevé et ensemencé sur milieu YMA (Yeast Malt Agar).

Entre 2010 et 2013, 122 champs ont été prospectés dans les régions céréalières du pays. Cependant, les isollements ont concerné 25 champs, prospectés en 2013, de la région Est du pays (Annaba [01], Sétif [03], Constantine [18] et Mila [03]). Cinq feuilles infectées sont choisies au hasard de chaque champ. Cinq isolats par lésion sont retenus aléatoirement après isolement à partir d'une lésion par feuille. En tout, 625 isolats sont retenus pour la caractérisation morpho-culturelle réalisée selon l'échelle de coloration décrite par **Siah et al.** (2008).

3. Evaluation de l'agressivité des isolats

Les tests sont conduits sous serre selon un dispositif en split plot à trois répétitions, en considérant deux facteurs (isolats et variétés), réalisés au niveau de l'unité de recherche de l'INRA Constantine (Fig. 9).



Figure 9 : Essai « Evaluation de l'agressivité des isolats »

A : Vu d'ensemble du dispositif expérimental ;

B et C : Inoculation par pulvérisation sous forme de rosée.

3.1. Matériel fongique

Au total, 26 isolats prélevés aléatoirement et issus de 25 champs (deux appartenant au même champ) sont testés (Tab. 2).

Tableau 2 : Provenance des isolats de *Z. tritici*

Code des isolats	Wilayate de provenance	Régions	Hôte d'isolement
ST1d	Constantine	El Haria	BD (GTA-Dur)
ST2t	Constantine	Hamma Bouziane	BT HD1220
ST3d	Constantine	Hamma Bouziane	BD (Vitron)
ST4d	Constantine	Bounouara	BD
ST5d	Constantine	Didouche	BD
ST6t	Constantine	El Khroub	BT
ST7d	Constantine	Zighoud	BD (Cirta)
ST8t	Mila	Gouarem	BT
ST9d	Mila	El Athmania	BD (GTA-Dur)
ST10d	Sétif	Al Alma	BD
ST11d	Constantine	Didouche	BD (GTA-Dur)
ST12d	Sétif	El Oueldja	BD
ST13d	Constantine	Didouche	BD (Cirta)
ST14d	Mila	Oued Segoum	BD
ST15d	Sétif	Chelghoum	BD
ST16t	Mila	Fergiona	BT (Arz)
ST17d	Mila	Tadjnante	BD
ST18t	Constantine	El Khroub	BT
ST19d	Mila	Chelghoum	BD
ST20d	Mila	Chelghoum	BD
ST21t	Constantine	Didouche	BT (HD1220)
ST22d	Constantine	Didouche	BD (GTA-Dur)
ST23t*	Constantine	El Khroub	BT
ST24t*	Constantine	El Khroub	BT
ST25t	Constantine	Ain Smara	BT
ST26d	Annaba	-	BD (GTA-Dur)

t : Blé tendre

d : Blé dur

* isolats du même champ

3.2. Matériel végétal

Une gamme de 16 variétés (blé tendre [05], blé dur [10] et triticales [01]) homologuées en Algérie est testée pour l'évaluation de l'agressivité des isolats (Tab. 3).

Tableau 3 : Gamme variétale (CNCC, 2009)

Espèce	Variété	Origine
Blé tendre	Ain abid	Espagne
	Arz (Beni Slimane)	CIMMYT (Mexique)
	Anapo	Italie
	Anforeta	Italie
	HD1220 (Hiddab)	CIMMYT (Mexique)
Blé dur	Boussalem	ICARDA-CIMMYT
	Cirta	Algérie
	Colosseo	Italie
	Core	Italie
	GTA-Dur	CIMMYT (Mexique)
	Ofanto	Italie
	Simeto (sersou)	Italie
	Vitron (hoggar)	Espagne
	Waha	ICARDA (Syrie)
Wahbi	Algérie	
Triticale	Juanillo (Chelia)	Maroc

3.3. Préparation de l'inoculum, inoculation et quantification de la maladie

L'inoculum est préparé à partir d'une culture âgée de 7 jours cultivée à 18°C sur milieu YMA. La suspension sporales est ajustée à 10^6 conidies ml^{-1} en y ajoutant une petite goutte de Tween 20. L'inoculation est réalisée par pulvérisation sous forme de rosée au stade 3 feuilles. L'humidité a été maintenue pendant 48 h en couvrant les pots avec du plastique (Fig. 9). Selon la méthode **Zuckerman *et al.* (1997)** modifiée, 21 jours après l'inoculation, le nombre de feuilles infectées (NFI) est estimé sur la base des trois premières feuilles de six plants et le pourcentage du recouvrement pycnidial de *Z. tritici* (% RP) est estimé selon l'échelle décrite par **Ziv et Eyal (1978)** (Fig. 10).

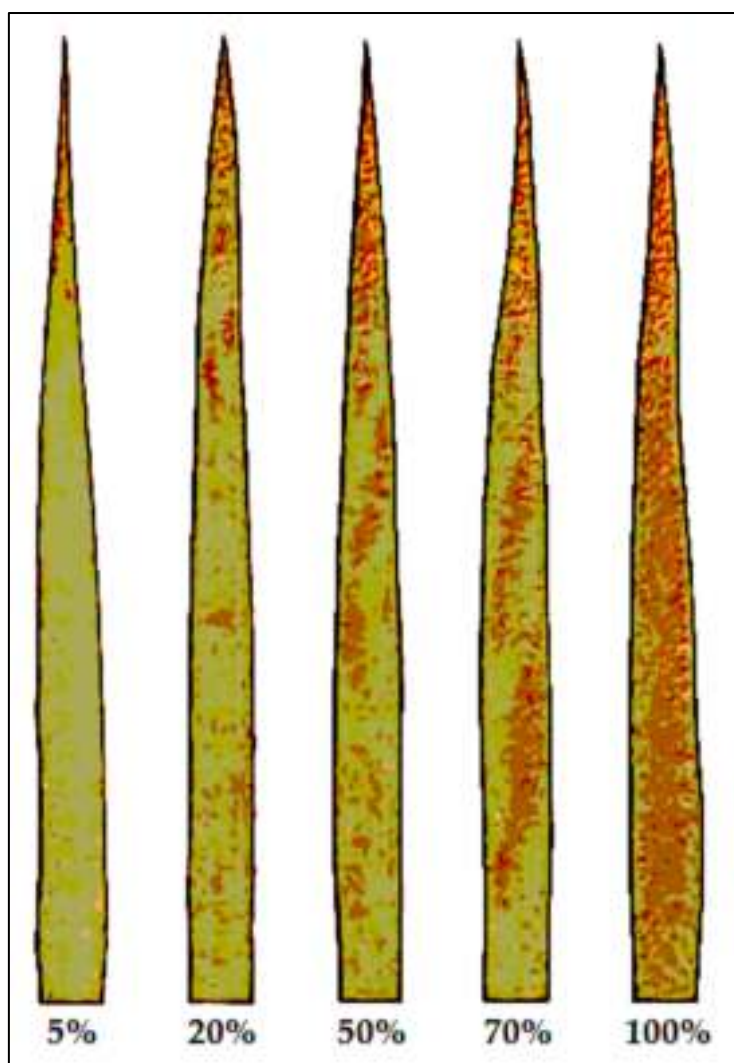


Figure 10 : Echelle du taux de recouvrement pycnidial décrite par Ziv et Eyal (1978)

3.4. Analyse statistique

L'analyse de la variance (ANOVA ; $P = 95\%$) et la classification en groupes homogènes, des isolats en fonction de l'agressivité et des variétés selon la sensibilité, avec le test de Tukey sont réalisées à l'aide du logiciel SPSS (version 20.0). Les classifications hiérarchiques en dendrogramme sont réalisées pour traiter les résultats en utilisant le logiciel STATISTICA (version 6).

4. Variabilité génotypique des isolats de *Z. tritici*

L'évaluation de la variabilité génétique est effectuée sur une gamme de 30 isolats obtenus de 27 champs de la région Est du pays. 26 isolats sont les mêmes que ceux de l'étude de l'agressivité du pathogène précédemment décrite, auxquels sont ajoutés 4 isolats choisis comme suit :

- ST9(1)d issu d'une autre lésion de la même feuille que le ST9d ;
- ST9(2)d issu du même champ que le ST9d ;
- ST27d isolé à partir d'un champ à El Khroub (Constantine) sur la variété de blé dur Cirta ;
- ST28t isolé à partir d'un champ à Hamma Bouziane (Constantine) sur la variété de blé tendre HD 1220.

4.1. Extraction d'ADN

4.1.1. Préparation du matériel fongique

L'extraction est réalisée à partir de 30 cultures d'isolats de *Z. tritici* âgées de 10 jours. Le stroma est raclé puis mis dans un Eppendorf de 1,5 ml. Ce dernier est placé dans de l'azote liquide et son contenu est broyé à l'aide d'un petit pilon. Les échantillons préparés sont conservés à -5 °C jusqu'à leur utilisation.

Le protocole d'extraction utilisé est celui de **Murray et Thompson (1980)** avec plusieurs modifications, afin d'optimiser et d'adapter le protocole à l'espèce étudiée.

4.1.2. Préparation du tampon d'extraction

Les produits composant le tampon d'extraction sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 4 : Composition du tampon d'extraction

Produits	Concentration finale	Quantité suffisante pour 10 ml de tampon
CTAB	2% (W/V)	0,2 g
NaCl 5 M	1,4 M	2,8 ml
EDTA 0,5 M pH8	20 mM	0,4 ml
Tris 1 M pH8	100 mM	1 ml
Mercapto-ethanol	0,2% (V/V)	20 µl

CTAB : Bromure d'hexadécyltriméthylammonium

EDTA : Éthylène Diamine Tétracétique

Par précaution, le Mercapto-éthanol est ajouté sous hotte-sorbone.

4.1.3. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est réalisée selon le protocole de **Murray et Thompson (1980)** avec plusieurs modifications afin d'optimiser et d'adapter le protocole à l'espèce étudiée en respectant les étapes suivantes :

- a- Rajouter 500 µl du tampon d'extraction, préalablement chauffé à 60°C, dans les tubes Eppendorf contenant les échantillons fongiques préalablement broyées ;
- b- Mettre les tubes au bain marie à 60°C pendant 30 min ;
- c- Ajouter 500 µl de chloroforme : isoamylalcool (24 : 1 v/v), agiter vigoureusement;
- d- Centrifuger à 14000 rpm pendant 10 min ;
- e- Transférer le surnageant dans un nouveau tube Eppendorf et ajouter 1 volume (environ 500 µl) d'isopropanol ;
- f- Agiter et centrifuger à 14000 rpm pendant 10 min ;
- g- Verser le surnageant et pipeter le reste d'isopropanol au fond du tube à l'aide d'une micropipette ;
- h- Ajouter 450 µl d'éthanol à 70% ;
- i- Centrifuger à 14000 rpm pendant 5 min ;
- j- Verser l'éthanol et pipeter le reste avec une micropipette. Sécher le culot à l'étuve ;
- k- Re-suspendre le culot dans 30µl de TE (Tris 10 mM pH8 et EDTA 1 mM).

Remarque : les étapes **a**, **c**, **e** et **g** se font obligatoirement sous une sorbonne.

4.2. Détermination des mating types

4.2.1. Amorces des mating types

Les mating types des isolats sont déterminés par l'utilisation d'une PCR-multiplex de séquences partielles des deux idiomorphes (**Waalwijk et al., 2002**). Les amorces utilisées pour l'amplification de l'idiomorphe mat1-1, générant un fragment de 340 pb sont:

5'-CCGCTTTCTGGCTTCTTCGCACTG-3'(F)

Et, 5'-TGGACACCA TGGTGAGAGAACCT-3'(R).

Les amorces utilisées pour l'amplification de l'idiomorphe mat1-2, générant un fragment de 660 pb, sont :

5'-GGCG CCTCCGAAGCAACT-3'(F)

Et, 5'-GATGCGGTTCTGGACTGGAG-3'(R).

4.2.2. Réactions PCR (Polymerase Chain Reaction)

Le mix utilisé pour les réactions PCR est composé de 2 µl de Tampon décrit par **Berraies et al. (2013)** contenant 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄, 0,1 % Triton X-100. Additionné de 0,5 µl de dNTP (100 mM), 0,2 µl de Taq polymérase (GoTaq Hot Start de marque Promega), 0,5 µl de chaque amorce (40 µM), 0,8 µl de MgCl₂ (25 mM) et 2 ul de l'ADN génomique de *Z. tritici* (concentration finale 10 ng/µl).

Les réactions PCR sont réalisées à l'aide d'un thermocycleur (Bio-Rad C1000) au laboratoire de biologie moléculaire du C.R.Bt (Centre de Recherche en Biotechnologie - Constantine), les conditions du cycle thermique (programme d'amplification) sont présentées ci-dessous :

- Incubation à 95°C pendant 10 minutes ;
- 40 cycles de dénaturation à 95°C pendant 1 minute, hybridation à 60°C pendant 30 secondes et élongation à 72°C pendant 1 minute ;
- Après le dernier cycle, les échantillons sont incubés à 72°C pendant 10 minutes, puis stockés à 4°C.

4.2.3. Migration pour la séparation des fragments sur gel d'agarose et visualisation des profils

Les amplicons sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% dans une cuve horizontal Murray and Thompson (HU20 Fisher Bande) complètement émergé dans un tampon TBE 1×. Après la coloration au bromure d'éthidium (BET), la visualisation se fait sous lumière UV ; les images sont capturées avec un système d'imagerie (Doc Print II) équipé d'une chambre noire et d'un appareil photo numérique.

Le gel d'agarose à 1,5% est préparé selon les étapes décrites ci-après :

- a- Peser 1,5 g d'agarose pour 100 ml de TBE 1× ;
- b- Faire bouillir ;
- c- Incuber à 60°C au bain marie pendant 10 minutes ;
- d- Couler dans la cuve d'électrophorèse ;
- e- Laisser refroidir ;
- f- Enlever le peigne ;
- g- Couvrir le gel avec du tampon TBE 1× ;
- h- Mélanger 5 µl de produit de PCR avec 1 µl d'allourdisseur (bleu) ;
- i- Charger dans le puits ;
- j- Charger 5 µl de marqueur de taille 1KB 50 pb ladder ;
- k- Faire migrer à 70 V pendant 30 minutes ;
- l- Colorer pendant 20 minutes dans un bain de bromure d'éthidium (20 µl dans 500 ml d'eau) ;
- m- Décolorer pendant 20 minutes dans un bain d'eau distillée ;
- n- Examiner le gel au transilluminateur UV ;
- o- Prendre une photo.

4.3. Evaluation de la diversité génotypique par les analyses SSR (Simple Sequence Repeat)

4.3.1. Amorces des SSR testés

Neuf amorces de types SSR décrite par **Owen *et al.* (1998)** sont utilisées pour la détermination de la variabilité génétique de *M. graminicola* (Tab. 5).

4.3.2. Réactions PCR

Le même mix utilisé pour l'étude de la détermination des mating types est réutilisé pour les Réaction PCR avec les amorces des SSR.

La température de dénaturation initiale est de 95°C pendant 10 min et la température d'élongation finale est de 72°C pendant 10 min pour les 9 couples d'amorces.

Les températures d'hybridation, pour les 40 cycles d'amplification, sont spécifiques pour chaque amorce (Tab. 6).

Tableau 5 : Séquences des amorces SSR testées

Nom	Motif répété	Séquence de l'amorce
ST2C10	(AGCGG) ₄	5'AGGCCGAGAACTTGCTTGCAG3' (F)
		5'AATGAACCGTCCCATGGACGTG3' (R)
ST1E7	(CGG) ₅	5'GATCTCGAGCAGGGCGGAAGT3' (F)
		5'TCACACGCTGGTCTGTGAATC3' (R)
ST2E4	(GGC) ₅	5'GAAGATCAACAGCAT GGGCGG3' (F)
		5'CTCCAGAGGGATCACAAAGGC3' (R)
ST1E3	(CGG) ₅	5'GTTCCGCCGGTCGAAGTCG3' (F)
		5'GCCAAGGCACTGCTGCTC3' (R)
ST1B3	(CGG) ₈	5'ACGTTACATCTTCATAACC3' (F)
		5'CTCTAGCTCTACCTTAAT3' (R)
ST1G7	(TG) ₉	5'ATGCTGAGAAGTTCGGTGAGG3' (F)
		5'CGTTCCTCCACCTCCTCCAACACT3' (R)
ST1A2	(GGC) ₇ /(GGT) ₂	5'TTTTCCTCTCTCCCGTGC3' (F)
		5'CTCTCGTCAACCCCAGAC3' (R)
ST1A4	(CCG) ₇	5'GGTTCGATGGAGAGATTT3' (F)
		5' TCACCTCCTCATCGCAGA3' (R)
ST1D7	(AC) ₂₂	5'ATCCTCCATTCACTACTGCAT3' (F)
		5'TGTGGAACAGGAATAGGCTTG3' (R)

Tableau 6 : Cycles d'amplification des réactions PCR pour les amorces SSR

Amorce	Cycles thermiques des réactions PCR
ST2C10	40 cycles : 95°C pendant 40 secondes, 63°C pendant 1 min. 72°C pendant 2 min
ST1E7	40 cycles : 95°C pendant 40 secondes, 59°C pendant 1 min. 72°C pendant 2 min
ST2E4	40 cycles : 95°C pendant 40 secondes, 61°C pendant 1 min. 72°C pendant 2 min
ST1E3	40 cycles : 95°C pendant 40 secondes, 55°C pendant 1 min. 72°C pendant 2 min
ST1B3	40 cycles : 95°C pendant 40 secondes, 45°C pendant 1 min. 72°C pendant 2 min
ST1G7	40 cycles : 95°C pendant 40 secondes, 59°C pendant 1 min. 72°C pendant 2 min
ST1A2	40 cycles : 95°C pendant 40 secondes, 51°C pendant 1 min. 72°C pendant 2 min
ST1A4	40 cycles : 95°C pendant 40 secondes, 47°C pendant 1 min. 72°C pendant 2 min
ST1D7	40 cycles : 95°C pendant 40 secondes, 55°C pendant 1 min. 72°C pendant 2 min

4.3.3. Révélation sur gel dénaturant (gel polyacrylamide)

La révélation sur gel dénaturant est réalisée selon le protocole de **Benbouza *et al.* (2006)** avec quelques modifications au niveau du laboratoire de biologie moléculaire du C.R.Bt – Constantine.

Avant la migration, les produits PCR ainsi que le marqueur moléculaire Ladder (10 pb) sont dénaturés en mélangeant 5 µl d'une solution de dénaturation avec 5 µl de l'ADN amplifié ou du Ladder. La dénaturation se fait à 95°C pendant 2 min à l'aide d'un thermocycleur.

La séparation des fragments se fait par électrophorèse sur gel dénaturant à 6% (Tab. 7) dans une cuve verticale (Sequi-Gen GT) menée d'un tampon de migration (TBE 1×). Après la coloration au nitrate d'argent, la visualisation se fait à l'aide d'une table à lumière blanche, les images sont capturées à l'aide d'un appareil photo numérique.

Pour la migration, la plaque est connectée à un générateur (APELEX PS 9009 TX) sous 1000 V et pendant 3 h.

Tableau 7 : Composition et réparation du gel dénaturant à 6%

n.	Composants	
1	Solution « 1 » (Stock à 40%)	38 g d'acrylamide et 2 g de bisacrylamide dans 100 ml d'eau pure
2	Solution « 2 » (TBE ×10)	- 107,8 g de TRIS (890 mM) - 55 g d'acide borique (890 mM) - 7,4 g d'EDTA (20 mM) Ajusté à 1000 ml avec de l'eau pure pH est rapporté à 8
3	Solution « 3 » (APS à 10%)	1g d'APS dans 10 ml d'eau pure
4		Urée
5		TEMED
6		Eau pure

Préparation :

Le gel dénaturant est composé de 202 g d'urée, 63 ml de la solution «1», 40 ml de la solution «2» et 156 ml d'eau pure.

Avant le coulage, pour 80 ml de gel, on rajoute 250 µl de solution «3» et 50 µl de TEMED

TBE : Tris, Borate, EDTA

TRIS : Trishydroxyméthylaminométhane ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol

EDTA : Éthylène Diamine Tétracétique

APS : Ammonium Persulfate

TEMED : N,N,N',N'-tetramethylenediamine

Coloration du gel au nitrate d'argent

Les trois solutions de coloration du gel et leurs composants sont décrits comme suit :

1. **Solution FIX STOP** : dans un récipient jaugé de 2 L contenant un peu d'eau distillée.

- Ajouter 200 ml d'éthanol absolu ;
- Ajouter 10 ml d'acide acétique ;
- Porter, avec de l'eau distillée, au trait à 2 L.

2. Solution FIX coloration

- Peser 3 g de Nitrate d'argent ;
- Mettre dans 2 L d'eau pure ;
- Ajouter, juste avant utilisation, 3 ml de Formaldéhyde (à 37%).

3. Solution de développement

- Dissoudre 30 g de NaOH dans 2 L d'eau distillée ;
- Ajouter, juste avant utilisation, 4 ml de Formaldéhyde (37%).

La coloration du gel se fait en 5 étapes

- 1^{er} bac : Solution FIX STOP (6-8 minutes).
- 2^{ème} bac : Solution FIX coloration (6-7 min).
- 3^{ème} bac : Eau de rinçage (quelque secondes).
- 4^{ème} bac : Solution de développement (3-5 min).
- Retour dans le 1^{er} bac: Solution FIX STOP durant environ 2 min.

4.3.4. Analyse des données

L'évaluation de la diversité génétique des 30 isolats retenus est réalisée à l'aide du logiciel NTSYS-pc version 2.21q.

Les données sont transformées en matrice binaire, « 1 » pour la présence et « 0 » pour l'absence de bande correspondant à chaque locus.

La fréquence des différents allèles pour chaque locus est calculée et la diversité génétique de la population est estimée en utilisant la formule de Nei (1973) comme suit :

$$H = 1 - \sum x_i^2$$

H est la diversité génétique de la population et x_i est la fréquence des différents allèles révélés par les marqueurs SSR.

La similarité / dissimilarité génétique entre les isolats est estimée par le coefficient de similarité Dice, du programme SAHN avec l'option UPGMA du logiciel NTSYS-pc. Les résultats obtenus sont représentés sous forme d'arbre (dendrogramme).

Aussi, une ACP (Analyse en Composantes Principales) est réalisée, avec le même logiciel, pour regrouper les isolats en fonction du nombre et de la taille des bandes amplifiées résultant de la PCR avec les 9 amorces utilisées.

L'analyse des haplotypes est réalisée à l'aide du logiciel « HAPLOTYPE ANALYSIS » décrit et établi par (Eliades et Eliades, 2009).

5. Recherche et caractérisation de la forme parfaite *M. graminicola*

5.1. Echantillonnage et prélèvement au champ

Les prospections réalisées entre septembre et novembre de l'année 2015 ont concerné, en particulier, 5 champs de la région de Constantine dans l'Est algérien. Les chaumes sont récupérés selon l'approche d'échantillonnage X-shaped de **Campbell et Madden (1990)**. La monoculture était pratiquée au cours des trois dernières années dans ces champs où la maladie apparaissait chaque année et se développait selon les conditions climatiques.

5.2. Observations microscopiques des organes du téléomorphe : pseudothèces, asques et ascospores

Les pseudothèces ressemblant à ceux du pathogène sont observés sous binoculaire sur les tiges puis collectées à l'aide d'une pipette Pasteur effilée, ensuite, examinées sous microscope de marque Leica en utilisant du lactophénol-bleu de méthylène afin d'identifier les asques et ascospores de *M. graminicola*.

5.3. Mensurations des pseudothèces, asques et ascospores

Les mesures exprimées en micromètre, sont le résultat de la moyenne de 50 répétitions pour chaque organe. La longueur et la largeur des asques et des ascospores sont évaluées par l'observation sous un microscope équipé d'un micromètre. Cependant, pour les pseudothèces étant de forme sphérique, seules les mesures du diamètre sont effectuées.

5.4. Technique d'isolement des ascospores

Les chaumes collectés, présentant les symptômes caractéristiques, sont découpés en pièces de 3 cm de longueur. Les échantillons sont désinfectés en utilisant une solution de 0,2% d'hypochlorite de sodium. Ils sont ensuite mis dans une chambre humide pour une durée de 24 h. Un pseudothèce est prélevé puis écrasé, dans des conditions d'asepsie, entre lame et lamelle avec une goutte d'eau distillée stérile, après identification sous microscope, les ascospores sont récupérés puis déposés sur milieu Yeast Malt Agar contenant du chloramphenicol (YMA⁺). Les boîtes de Pétri sont incubées à l'obscurité, pendant 4 jours à 22°C.

6. Essais de méthodes de lutte contre *Z. tritici*

6.1. Effet de la fertilisation azotée et potassique sur le développement de la maladie

6.1.1. Présentation de l'essai

L'expérimentation est réalisée au niveau de la station expérimentale de l'ENSA. Quatre modalités de fertilisation (Tab. 8) sont testées sur une variété de blé dur « Vitron » connue pour sa sensibilité vis-à-vis de la tache septorienne.

L'expérimentation est menée selon un dispositif en blocs aléatoires complet à 4 répétitions dont le facteur étudié est la modalité de fertilisation.

L'isolat de *Z. tritici* utilisé est obtenu à partir de symptômes collectés sur la variété « Vitron » de la région Centre du pays (ITGC, Alger).

Tableau 8 : Traitements de fertilisation expérimentés

MODALITÉS	COMPOSITION
Modalité 1	Témoin sans fertilisation azotée et potassique.
Modalité 2	2 q/ha avant le semis d'un engrais composé (8-10-22) .
Modalité 3	3 q/ha avant le semis de l'engrais composé (8-10-22) + 1 q/ha d'engrais azoté (46 % d'azote uréique) au tallage et 1 q/ha au stade épi 1 cm.
Modalité 4	Modalité 3 + 5 l/ha d'une solution liquide à base de potassium (33 % = 500 g/l de K ₂ O) (2,5 l/ha au stade 1 nœud et le reste 15 jours après).

6.1.2. Inoculation en plein champ

L'inoculum est obtenu à partir d'une culture âgée de 10 jours de l'isolat de *Z. tritici*, cultivée sur milieu YMA, ayant l'aspect d'une crème légèrement rosâtre (Yeast-like). La suspension de conidies est ajustée à 10⁶ conidies ml⁻¹, 5 gouttes par litre de Tween 20 ont été ajoutées. L'inoculation a été effectuée au stade 3 feuilles et les microparcelles inoculées sont couvertes avec un film plastique translucide pendant 48 h afin de maintenir un taux d'humidité favorable pour le développement du pathogène.

6.1.3. Paramètres étudiés

L'évaluation de la sévérité de la maladie est estimée aux stades plein tallage, gonflement et remplissage du grain, en considérant les paramètres ci-après :

- Nombre de feuilles atteintes (NFA) ;
- Nombre de lésions par feuille (NL) ;
- Progression verticale de la maladie (PV), selon l'échelle de notation de 0 à 9 décrite par **Saari et Prescott (1975)** ;
- Pourcentage du recouvrement pycnidial (RP%), selon l'échelle décrite par **Ziv et Eyal (1978)**;
- L'indice d'attaque moyen (IAM) est calculé selon la formule ci-après, dans le cas de notre étude, l'IAM est calculé afin d'évaluer l'intensité de la maladie selon les modalités de fertilisation ;

$$\text{IAM} = \frac{\sum \text{des degrés d'attaque}}{\text{Nombre total de plantules utilisées}}$$

- Le rendement estimé en grain est calculé selon la formule décrite par **Briffaux (1987)**.

$$\text{Rendement estimé (q/ha)} = \text{nombre d'épi/m}^2 \times \text{nombre de grains / épi} \\ \times \text{poids de 1000 grains} \times 10^{-4}$$

6.1.4. Analyse statistique

L'analyse de la variance est réalisée à l'aide du logiciel "STATISTICA" version 6. La comparaison des moyennes par la méthode de la plus petite différence significative (PPDS) est adoptée.

6.2. Test de lutte chimique

Les isolats utilisés pour tester l'efficacité de quatre matières actives sont choisis pour leur virulence établie préalablement (voir le test d'évaluation de l'agressivité). Les six isolats retenus sont : ST4d, ST6t, ST7d, ST9d, ST17d et ST21t.

6.2.1. Choix des matières actives

Les quatre matières actives testées appartiennent à deux groupes de fongicides, les Strobilurines (Trifloxystrobin) et les Triazoles (Tebeconazole, Propiconazole et Epoxiconazole).

L'intervalle des concentrations étudiées des quatre matières actives inclut les doses recommandées dans le commerce. Les doses de fongicides testées sont au nombre de six (06), soit : D1 = 100 ; D2 = 10 ; D3 = 1 ; D4 = 0,1 ; D5 = 0,01 ; D6 = 0,001 mg/l.

L'essai est mené en randomisation totale à trois répétitions en considérant deux facteurs étudiés (matière active et dose).

6.2.2. Technique des puits

La technique de puits décrite par **Dorman et al. (2000)** consiste à confectionner un puit circulaire de 6 mm de diamètre dans le milieu gélosé à l'aide d'un emporte-pièce stérile. Une quantité de 80 µl de la substance active est versée dans le puit (Fig. 9). La substance active diffuse radialement en créant une zone d'inhibition circulaire à la

surface du milieu de culture (YMA) préalablement ensemencé avec une suspension de *Z. tritici* cultivé en milieu liquide (Yeast Malt) durant 7 jours.

L'essai de l'efficacité des matières actives fongicides est mené à l'aide de boîtes compartimentées de 9 cm de diamètre où chaque compartiment représente une dose.

Les boîtes sont incubées sous des conditions de lumière continue à 24°C pendant 7 jours.

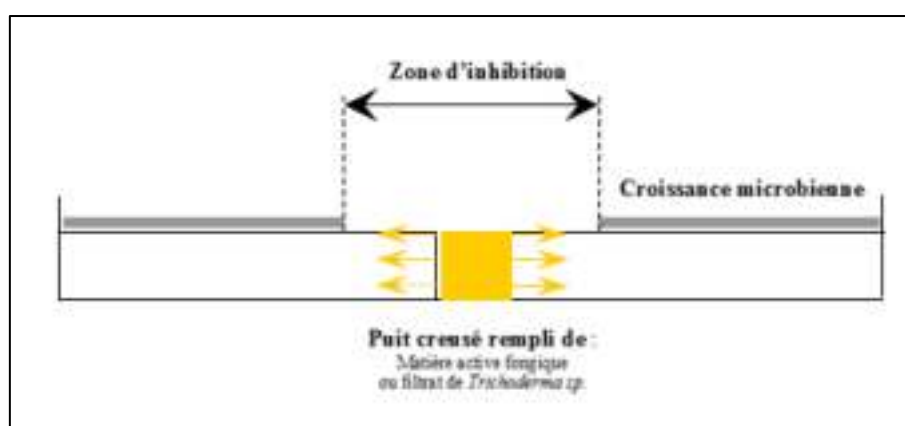


Figure 11 : Technique des puits

6.2.3. Estimation du taux de croissance des colonies de *Z. tritici*

Au bout de 7 jours d'incubation l'estimation du taux de croissance des isolats de *Z. tritici* en présence de la matière active est réalisée.

6.2.4. Analyses statistiques

L'analyse de la variance (ANOVA) à deux facteurs (Isolats et doses de fongicide) et la classification en groupes homogènes, du taux de croissance des colonies de *Z. tritici*, avec le test de Tukey sont réalisées à l'aide du logiciel SPSS (version 20.0). Des illustrations en histogrammes sont réalisées pour la lecture des résultats.

6.3. Lutte biologique

6.3.1. Matériel fongique utilisé

Les mêmes isolats de *Z. tritici* utilisés pour la partie « lutte chimique » sont considérés pour cette partie.

Les isolats de *Trichoderma* testés sont obtenus à partir d'échantillons de sol appartenant à la rhizosphère de quatre parcelles de production de tomate dans la Wilaya de Jijel (Djimar) par M. Debbi A., Doctorant à l'ENSA. Le protocole d'isolement est décrit par **Vargas Gila et al. (2009)**.

Les isolats de *Trichoderma* sont caractérisés par méthodes moléculaires à l'aide de marqueurs. Un des quatre isolats est *T. asperelloides* (Tr1) les trois autres sont des *T. asperellum* (Tr2, Tr3 et Tr4).

L'essai est mené en randomisation totale à trois répétitions en considérant deux facteurs étudiés (matière active et dose).

6.3.2. Activité des filtrats des *Trichoderma sp.*

La préparation des filtrats des isolats de *Trichoderma* est réalisée selon le protocole ci-dessous:

Des flacons de 250 ml contenant 50 ml de milieu liquide à base de pomme de terre et de glucose, sontensemencés par 5 explants de *Trichoderma* de 5 mm de diamètre, prélevés sur une culture jeune de 7 joursensemencée sur milieu PDA solide (Potato Dextrose Agar).

Après 7-10 jours d'incubation à 25°C en agitation ; les filtrats sont récupérés en séparant le mycélium par filtration sur tissu (tulle) stérilisé. Avant l'application, la solution est filtrée une seconde fois à l'aide d'un filtre stérile de 0,2 µm.

6.3.3. Technique des puits

La même technique de puits précédemment décrite lors des tests fongicides est utilisée.

6.3.4. Estimation du taux de croissance des colonies de *Z. tritici*

Au bout de 7 jours d'incubation, l'estimation du taux de croissance des isolats de *Z. tritici* en présence des quatre filtrats de *Trichoderma sp.* est évalué.

6.3.5. Analyses statistiques

L'analyse de la variance (ANOVA) à deux facteurs (Isolats de *Z. tritici* et filtrats de *Trichoderma sp.*) et la classification en groupes homogènes, du taux de croissance des colonies de *Z. tritici*, avec le test de Tukey sont réalisées à l'aide du logiciel SPSS (version 20.0). Des illustrations en histogrammes sont réalisées pour la lecture des résultats.

Résultats et interprétation

1. Occurrence et sévérité de la tache septorienne en Algérie

Les symptômes caractéristiques de la tache septorienne observés au champ sont des nécroses plus ou moins allongées, qui peuvent couvrir dans certains cas la majorité de la surface foliaire et parsemées de pycnides, dont le pourcentage de recouvrement pycnidial est variable (Fig. 12).

Au cours de la campagne 2010, 12 champs prospectés sur 18, soit 66,67%, ont présenté des symptômes typiques de la tache septorienne. Pour les campagnes 2011 et 2013, 104 champs prospectés, la maladie est présente dans 60 champs (57,67%). Au total, sur les 122 champs prospectés, au cours des trois années, 72 champs présentent la maladie de la tache septorienne (Tab. 9). La septoriose est présente dans la majorité des régions où la culture du blé est pratiquée, soit 59% des champs prospectés sont infectés.

Au cours des prospections, nous avons noté que la présence et la sévérité de la maladie diffèrent principalement selon les étages bioclimatiques. Dans les régions subhumides la sévérité et la dispersion de la maladie sont particulièrement observées dans les Wilayates d'Alger, d'Annaba, de Skikda et de Blida, les valeurs les plus élevées selon l'échelle « double digit » atteignent 98 et 99.

Cependant, nous avons également noté que dans certaines Wilayate de la région semi-aride où la céréaliculture est dominante dans un système de monoculture, c'est le cas des Wilayate de Constantine, Ain Témouchent et Tiaret avec une valeur qui varie entre 75 et 98 selon l'échelle décrite par Eyal (1978).

Pour les Wilayate de Saïda et de Mascara la maladie ne s'était manifestée que sur les premières feuilles avec une valeur de (11) selon l'échelle.

Tableau 9 : Prévalence et sévérité de la tache septorienne du blé en Algérie

Etage bioclimatique	Wilayat	Champs prospectés entre 2010-2013	Champs infectés par la septoriose	Double digit 00-99 (Progression verticale et sévérité de la maladie)
Humide	Skikda	1	1	98
	Ain Defla	4	3	33 - 55
Subhumide	Alger	6	5	53 - 99
	Annaba	1	1	98
	Blida	4	2	31 - 98
	Boumerdès	8	5	51 - 75
	Guelma	1	1	75
	Mila	14	7	75
	Tipaza	4	1	31
	Tizi-Ouzou	2	2	31
Sous – Total 1		44	27/44 (61%)	-
Semi-aride	Ain Témouchent	6	4	53 - 98
	Bouira	6	2	11 - 31
	Chlef	4	2	31 - 73
	Constantine	30	22	75
	Mascara	5	1	11
	Réлизane	3	2	53
	Saida	2	1	11
	Sétif	10	3	51 - 53
	Tiaret	9	6	75 - 98
Tlemcen	2	1	51	
Sous – Total 2		77	44/77 (57%)	-
Totaux		122 champs	72/122 (59%)	-

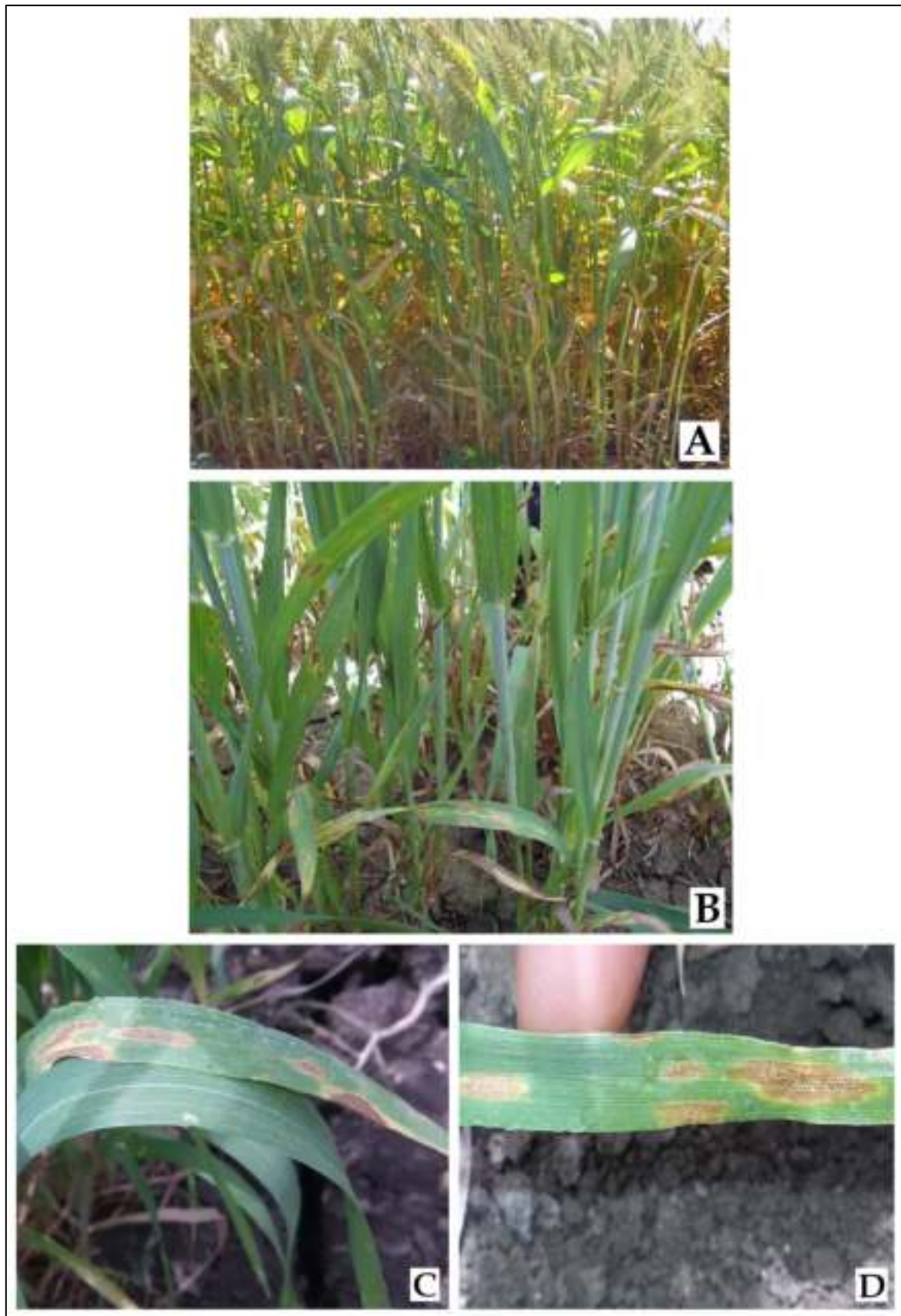


Figure 12 : Symptômes caractéristiques de la tache septorienne du blé en plein champ

A : Vue d'ensemble d'un champ de blé infesté par *Z. tritici* dans la Wilayat de Tiaret ; **B :** Infestation des plants de blé à différents étages foliaires ; **C et D :** lésions de *Z. tritici* sur feuille.

2. Caractérisation morphologique des isolats de *Z. tritici*

Au cours des isolements, sous conditions de chambre humide, différents aspects des cirrhes exsudés sont observés. Il peut être blanchâtre ou marron claire, de forme globuleuse ou en fil fin et enroulé (Fig. 13).

Les observations phénotypiques de l'aspect cultural des colonies obtenues des isolements de *Z. tritici* sur milieu solide YMA âgées de 10 jours montrent une grande diversité de texture et de couleur. Les isolats de couleur rosâtre ont une texture crémeuse (Yeast Like), qui peut couvrir entièrement le milieu de culture ou sous forme de colonies qui suivent les lignes d'ensemencement. Les isolats de couleur sombre sont solides et compacts (en forme de bourrelet stromatique). Il est à noter que la couleur rose est la plus dominante (foncée 42,88%, claire 24,16% et très claire 27,04%), le brun foncé n'occupe que 5,92% de l'ensemble de cultures (Fig. 14). Les observations microscopiques révèlent des spores caractéristiques de *Z. tritici*, des spores filiformes et hyalines (Fig. 14).

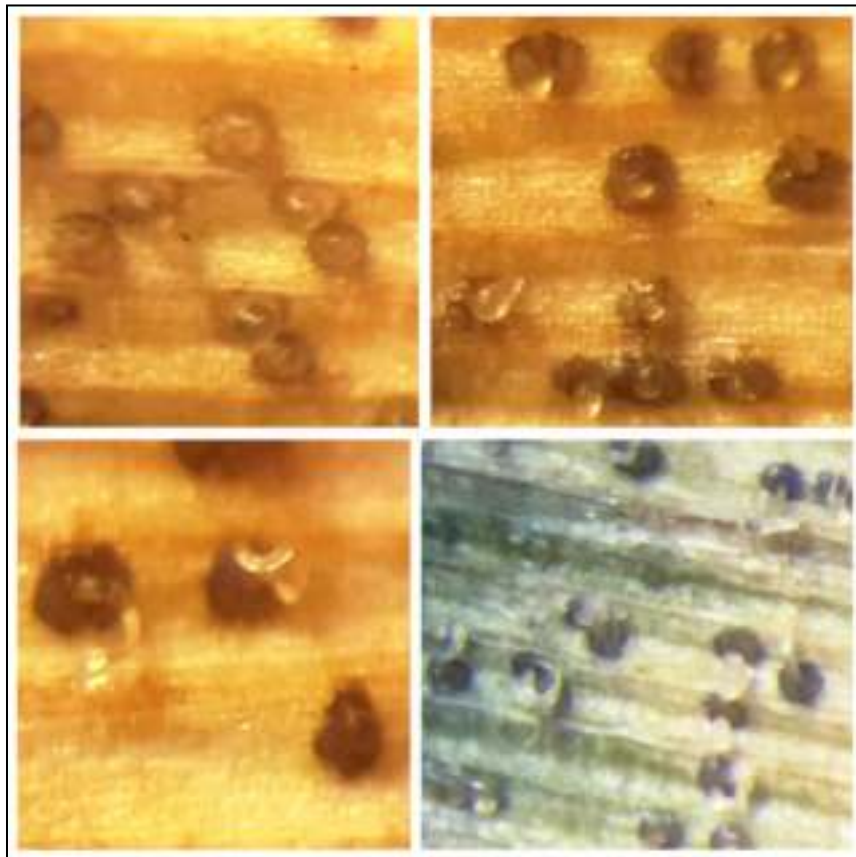


Figure 13: Différents aspects des cirrhes de *Z. tritici*

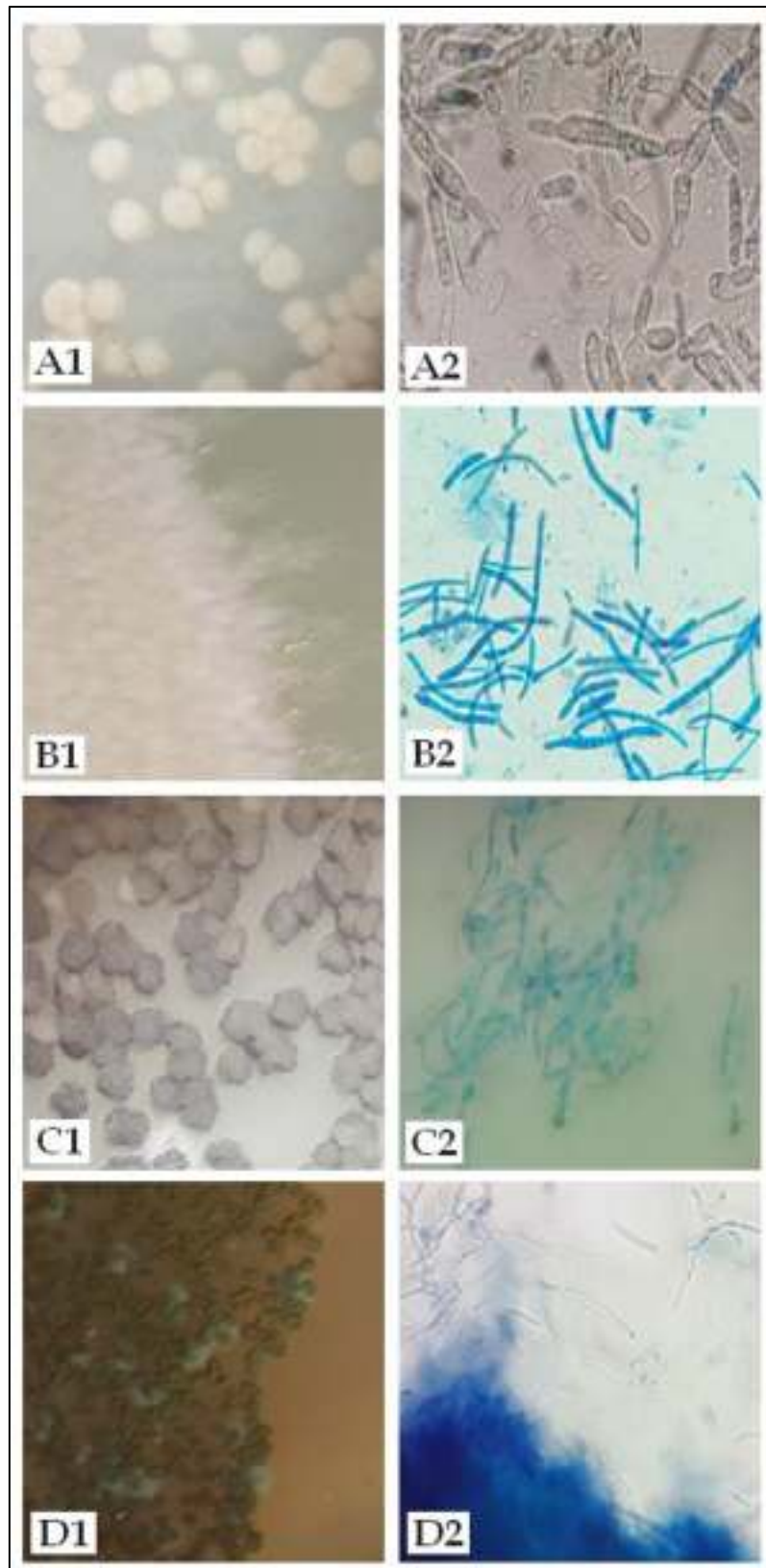


Figure 14 : Caractérisation culturelle et microscopique de *Z. tritici* sur milieux YMA

A1 et **A2** : Colonies rose très claire et pycnidiospores issus par bourgeonnement ($\times 1000$) ; **B1** et **B2** : colonies rose claire et pycnidiospores caractéristiques ($\times 400$) ; **C1** et **C2** : Colonies rose foncé et pycnidiospores caractéristiques ($\times 400$) ; **D1** et **D2** : Colonies brun foncé, pycnidiospores et mycelium ($\times 400$).

3. Agressivité des isolats et comportement variétal

L'agressivité des isolats et le comportement des variétés testées sont estimés en fonction du nombre de feuilles infectées (NFI) et le pourcentage de recouvrement pycnidial (RP%).

Le NFI varie entre 0 et 0,41 selon les isolats de *Z. tritici* testés, la variété HD1220 a montré le NFI le plus élevé de la gamme variétal (0,62), la moyenne du RP% au niveau de cette variété est le plus élevé avec 32,88%, contrairement aux variétés Ain abid, Colosseo et Simeto qui n'ont pas montré de symptômes caractéristiques. le RP% le plus élevé est obtenu avec l'isolat ST17d d'une valeur de 22,7%.

L'analyse de la variance à un facteur du nombre de feuilles infectées (NFI) et du pourcentage du recouvrement pycnidial (%RP) des 26 isolats testés sur la gamme d'hôte montre une différence très hautement significative pour les deux paramètres (Annexe 1).

Cinq pathotypes se distinguent pour le paramètre NFI. Les isolats les plus virulents selon ce paramètre sont ST9d, ST17t et ST21t avec un nombre maximum de feuilles infectées enregistré de 0,41 (soit la moyenne de 8/18, 7/18 et 7/18). Pour le paramètre %RP, six pathotypes sont obtenus. Les isolats les plus agressifs selon ce paramètre sont ST4d, ST17t et ST21t (Fig. 15 ; Tab. 10).

Nous avons noté que le lieu de prélèvement de l'isolat n'influence pas systématiquement son niveau d'agressivité. Les deux isolats ST19d et ST20d sont issus du même champ et ont un comportement différent vis-à-vis des variétés étudiées. En revanche, les isolats ST17t et ST21t obtenus de deux champs différents, appartiennent au même pathotype. Sur les 26 isolats testés 10 isolats montrent une spécificité physiologique pour le blé tendre ou le blé dur ; seuls ST9d et ST20d ont présenté des symptômes sur les trois espèces étudiées (blé dur, blé tendre et triticales).

L'étude statistique à un facteur du comportement (résistance ou sensibilité) des 16 variétés vis-à-vis de la gamme d'isolat montre une différence très hautement significative pour les deux paramètres étudiés. Quatre groupes homogènes se distinguent pour les deux paramètres NFI et %RP (Tab. 11). Les variétés les plus sensibles sont HD 1220 (Fig. 16) et Waha. Tandis que les variétés les plus résistantes sont Ain abid, Colosseo et Simeto. Ces dernières n'ont présentées aucun symptôme.

Tableau 10 : Classification en groupes homogènes des 26 isolats étudiés de *Z. tritici* selon leur agressivité

Isolat de <i>Z. tritici</i>	NFI	RP%
ST1d	0,03 ^{cde}	1,87 ^f
ST2t	0,11 ^{cde}	8,75 ^{bcdef}
ST3d	0,02 ^{de}	4,37 ^{def}
ST4d	0,27 ^{abc}	21,25 ^{ab}
ST5d	0,10 ^{cde}	5,93 ^{cdef}
ST6t	0,22 ^{abcde}	10,62 ^{abcdef}
ST7d	0,27 ^{abc}	17,50 ^{abcd}
ST8t	0,02 ^{de}	0,31 ^f
ST9d	0,39^a	16,87 ^{abcde}
ST10d	0,01 ^e	1,25 ^f
ST11d	0,26 ^{abcd}	10,62 ^{abcdef}
ST12d	0,00 ^e	0,00 ^f
ST13d	0,04 ^{cde}	1,56 ^f
ST14d	0,06 ^{cde}	8,75 ^{bcdef}
ST15d	0,02 ^{de}	2,50 ^f
ST16t	0,02 ^{de}	3,43 ^{ef}
ST17d	0,37 ^{ab}	22,5^a
ST18t	0,04 ^{cde}	3,12 ^f
ST19d	0,22 ^{abcde}	18,43 ^{abc}
ST20d	0,13 ^{bcde}	9,37 ^{bcdef}
ST21t	0,41^a	21,25 ^{ab}
ST22d	0,13 ^{bcde}	11,87 ^{abcdef}
ST23t	0,02 ^{de}	4,37 ^{def}
ST24t	0,01 ^e	1,25 ^f
ST25t	0,01 ^e	1,25 ^f
ST26d	0,03 ^{cde}	3,75 ^{ef}

NFI : Nombre de feuilles infectées ; **RP%** : Recouvrement pycnidial
Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents.

Tableau 11 : Classification des groupes homogènes représentant le comportement des 16 variétés étudiées de blé dur ; blé tendre et triticales

Espèce	Variété	NFI	RP%
Blé tendre	Ain abid	0,00 ^d	0,00 ^d
	Arz (Beni Slimane)	0,07 ^{cd}	5,00 ^{cd}
	Anapo	0,01 ^d	1,92 ^{cd}
	Anforeta	0,16 ^{bcd}	6,53 ^{cd}
	HD1220 (Hiddab)	0,62^a	32,88^a
Blé dur	Boussalem	0,01 ^d	2,69 ^{cd}
	Cirta	0,17 ^{bcd}	9,03 ^{cd}
	Colosseo	0,00 ^d	0,00 ^d
	Core	0,02 ^d	2,69 ^{cd}
	GTA-Dur	0,27 ^b	10,96 ^d
	Ofanto	0,01 ^d	0,76 ^d
	Simeto (sersou)	0,00 ^d	0,00 ^d
	Vitron (hoggar)	0,22 ^{bc}	21,34 ^b
	Waha	0,27 ^b	28,46 ^{ab}
	Wahbi	0,11 ^{bcd}	4,80 ^{cd}
Triticale	Juanillo (Chelia)	0,02 ^d	3,84 ^{cd}

Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents.

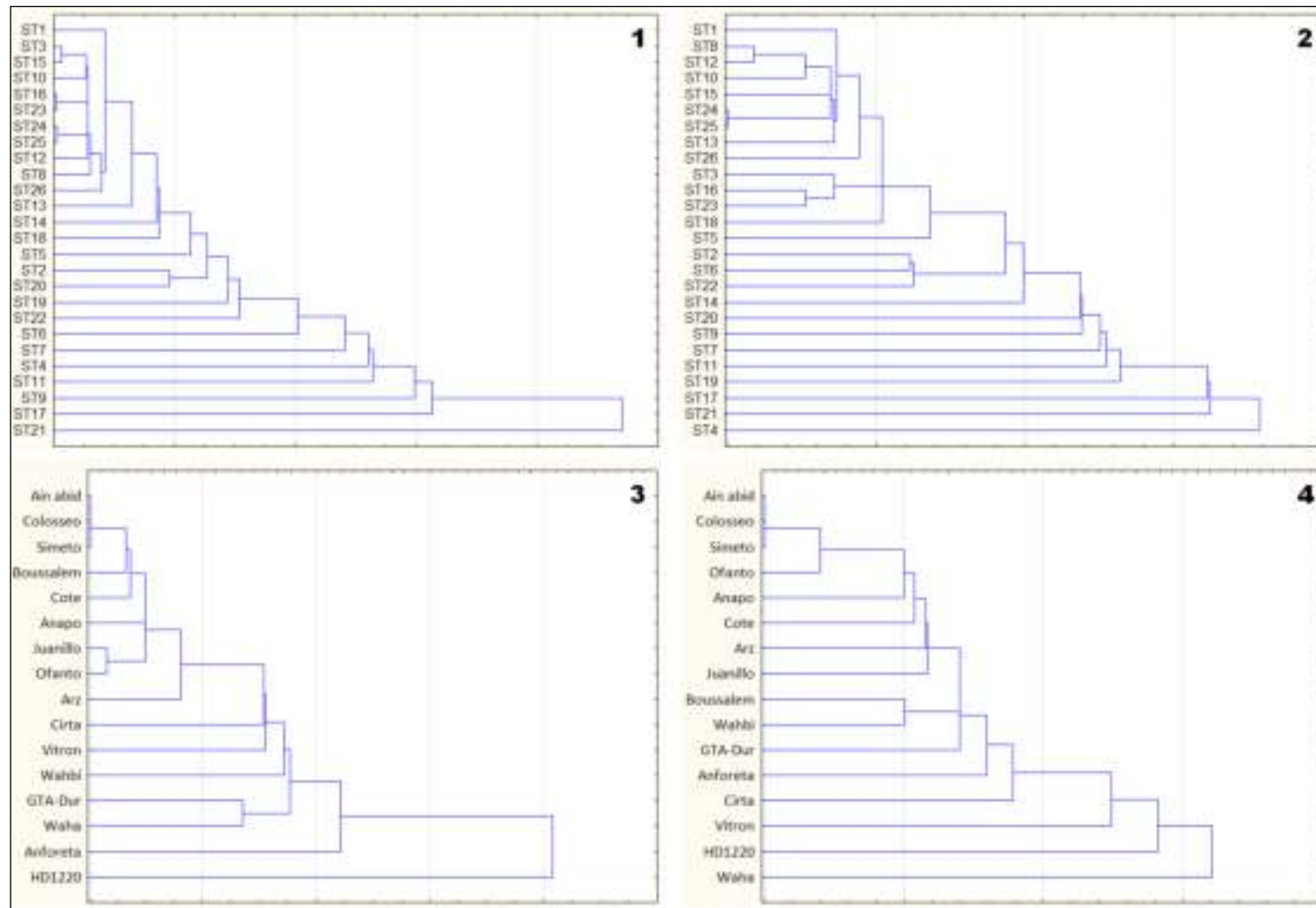


Figure 15 : Classification hiérarchique (Distances Euclidiennes) des isolats (1 et 2) et des variétés (3 et 4)

1 : Isolats × Nombre de feuilles infectées par plant ; 2 : Isolats × Recouvrement pycnidial

3 : Variétés × Nombre de feuilles infectées par plant ; 4 : Variétés × Recouvrement pycnidial



Figure 16. Symptômes engendrés par l'isolat ST21 sur la variété HD1220 de blé tendre selon l'échelle décrite par Ziv et Eyal (1978)

4. Variabilité génotypique

4.1. Détermination des mating types

Les 30 isolats obtenus de 27 champs de la région Est du pays ont été caractérisés par une PCR-multiplex afin de déterminer les deux idiomorphes (mat 1-1 et mat 1-2). Les résultats révèlent que les deux idiomorphes sont approximativement présents en proportions égales (56,67% de mat1-1 et 43,33% de mat1-2) (Tab. 12 ; Fig. 17).

Deux isolats sur les trois issus du même champ (ST9d et ST9(1)d) sont du type mat1-1 tandis que ST9(2)d est du type mat1-2. Parmi les 20 isolats obtenus à partir de

variétés de blé dur, 11 isolats sont de type mat1-1 et 9 isolats sont de type mat1-2. Sur 10 isolats issus de blé tendre 6 sont de type mat1-1 (Tab.12).

Il est à noter qu'aucune corrélation entre les mating types (mat1-1 ou mat1-2) et l'agressivité des isolats n'est observée. Sur les six isolats les plus agressifs (ST4, ST6, ST7, ST9, ST17 et ST21) trois sont de type mat1-1 et trois de type mat1-2.

Tableau 12 : Classification des isolats selon les mating type (mat 1-1 et mat 1-2)

Isolat	Idiomorphe	Isolat	Idiomorphe
ST1d	Mat1-1	ST16t	Mat1-1
ST2t	Mat1-1	ST17d	Mat1-2
ST3d	Mat1-2	ST18t	Mat1-2
ST4d	Mat1-1	ST19d	Mat1-1
ST5d	Mat1-1	ST20d	Mat1-2
ST6t	Mat1-1	ST21t	Mat1-2
ST7d	Mat1-2	ST22d	Mat1-1
ST8t	Mat1-2	ST23t	Mat1-2
ST9d	Mat1-1	ST24t	Mat1-1
ST10d	Mat1-1	ST25t	Mat1-1
ST11d	Mat1-2	ST26d	Mat1-2
ST12d	Mat1-1	ST27d	Mat1-2
ST13d	Mat1-1	ST28t	Mat1-1
ST14d	Mat1-2	ST9(1)d	Mat1-2
ST15d	Mat1-1	ST9(2)d	Mat1-1

t : Blé tendre

d : Blé dur

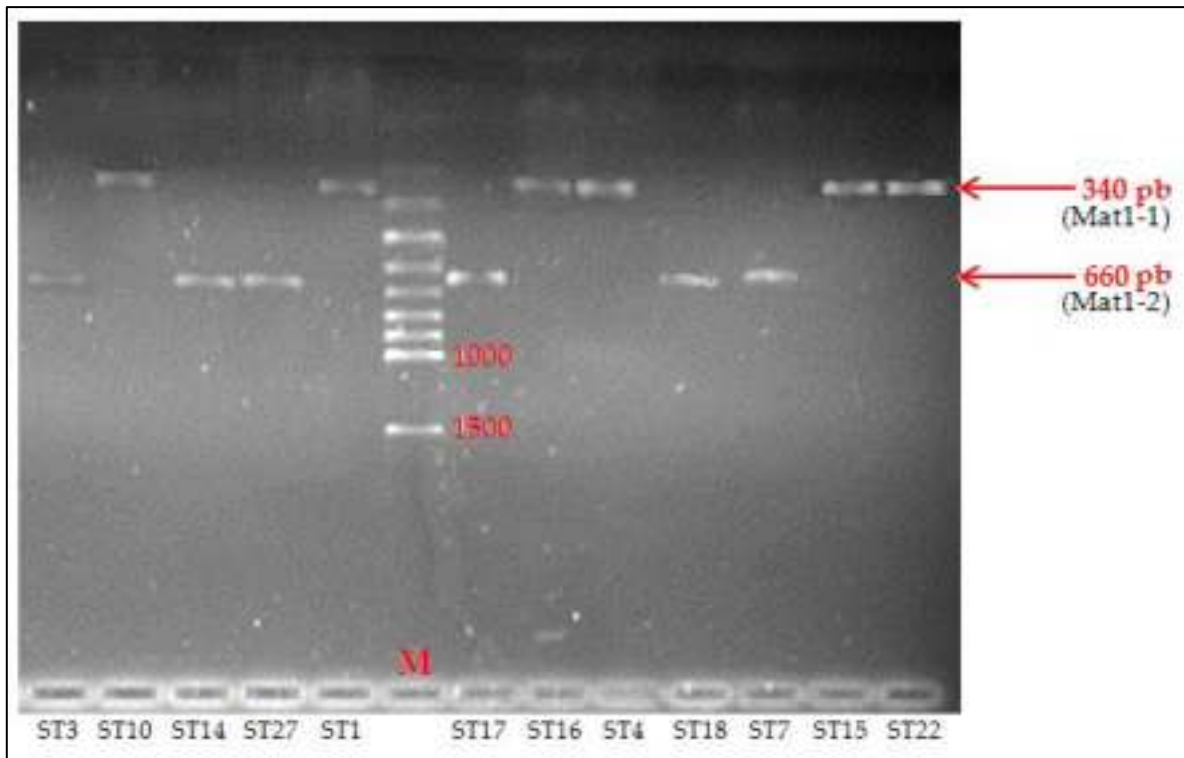


Figure 17 : Gèle agarose de la Multiplex-PCR pour la détermination des mating type de *Z. tritici*

M : marqueur de taille

4.2. Analyses par les marqueurs SSR (Simple Sequence Repeat)

La diversité génotypique des 30 isolats de *Z. tritici* a été évaluée en utilisant 9 marqueurs SSR. Toutes les amorces ont été amplifiées sous les conditions définies par le test. L'amorce ST1G7 est celle qui a plus amplifiée avec 21 isolats sur 30. Tandis que ST1B3 est la moins amplifiée avec seulement 7 isolats sur la gamme de 30.

Le nombre d'allèles produits par les différentes amorces varie entre 2 et 5 allèles avec une moyenne de 4, alors que l'intervalle de taille observé de l'ensemble des amorces est situé entre 85 et 297 pb (Tab. 13 ; Fig 18 et Fig. 19).

L'isolat ST20d n'a amplifié avec aucune des neuf amorces ; la quantité de l'ADN dans cet échantillon a été vérifiée à l'aide du Nanodrop et le résultat était satisfaisant. L'absence d'amplification peut s'expliquer par un génotype de cet isolat complètement différent des autres isolats de la gamme ou bien l'échantillon est contaminé ce qui a bloqué l'amplification.

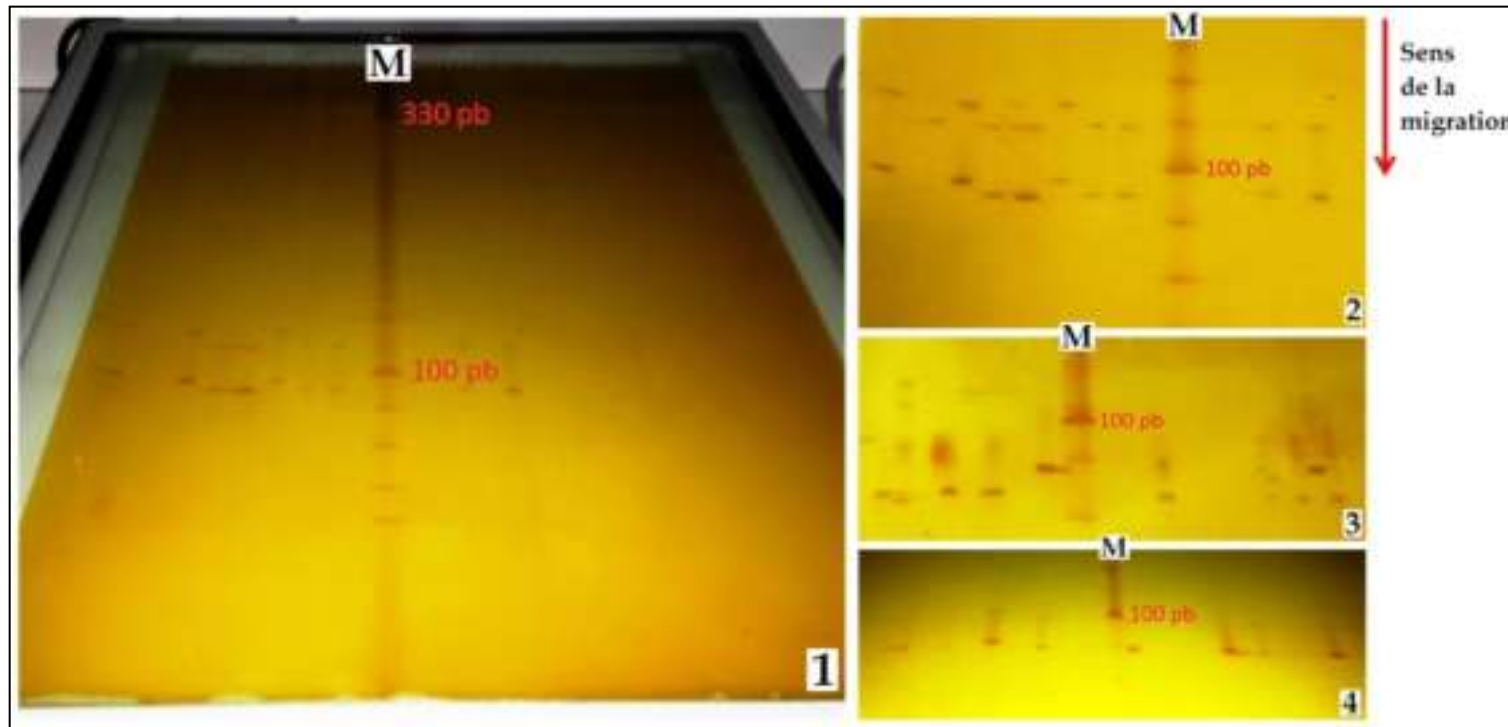


Figure 18 : Révélation sur gel polyacrilamide (marqueurs de types SSR)

1 : Plaque de polyacrilamide sur table à lumière blanche ; 2, 3 et 4 : différents aspects d'amplification avec trois amorces SSR, respectivement, ST1E7, ST1D7 et ST2E4.

Tableau 13 : Matrice des résultats de l'amplification des neuf amorces SSR avec les 30 isolats, nombre d'allèles et la taille des amplicons (pb)

	ST1E7 =126	ST1E7 =116	ST1E7 =103	ST1E7 =96	ST2E4 =102	ST2E4 =85	ST1E3 =90	ST1E3 =122	ST1E3 =139	ST1E3 =196	ST1E3 =207	ST1B3 =270	ST1B3 =257	ST1B3 =240	ST1B3 =212	ST1B3 =186	ST1A4 =101	ST1A4 =124	ST1A4 =143	ST1A4 =171	ST2C10 =121	ST2C10 =103	ST1A2 =205	ST1A2 =217	ST1A2 =238	ST1A2 =262	ST1A2 =297	ST1D7 =98	ST1D7 =107	ST1D7 =115	ST1D7 =125	ST1G7 =148	ST1G7 =122	ST1G7 =93		
ST1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	
ST2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
ST3	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
ST4	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
ST5	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	
ST6	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ST7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
ST8	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	
ST9	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	
ST9(1)	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	
ST9(2)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	
ST10	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
ST11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
ST12	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ST13	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ST14	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ST15	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
ST16	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
ST17	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ST18	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
ST19	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1
ST20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ST21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	
ST22	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	
ST23	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ST24	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
ST25	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
ST26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	
ST27	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
ST28	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0

1 : Présence (Bande amplifiée visible à la taille indiquée)

0 : Absence (Pas de bande amplifiée à la taille indiquée)

ST20 (rouge) : n'a amplifié avec aucune amorce

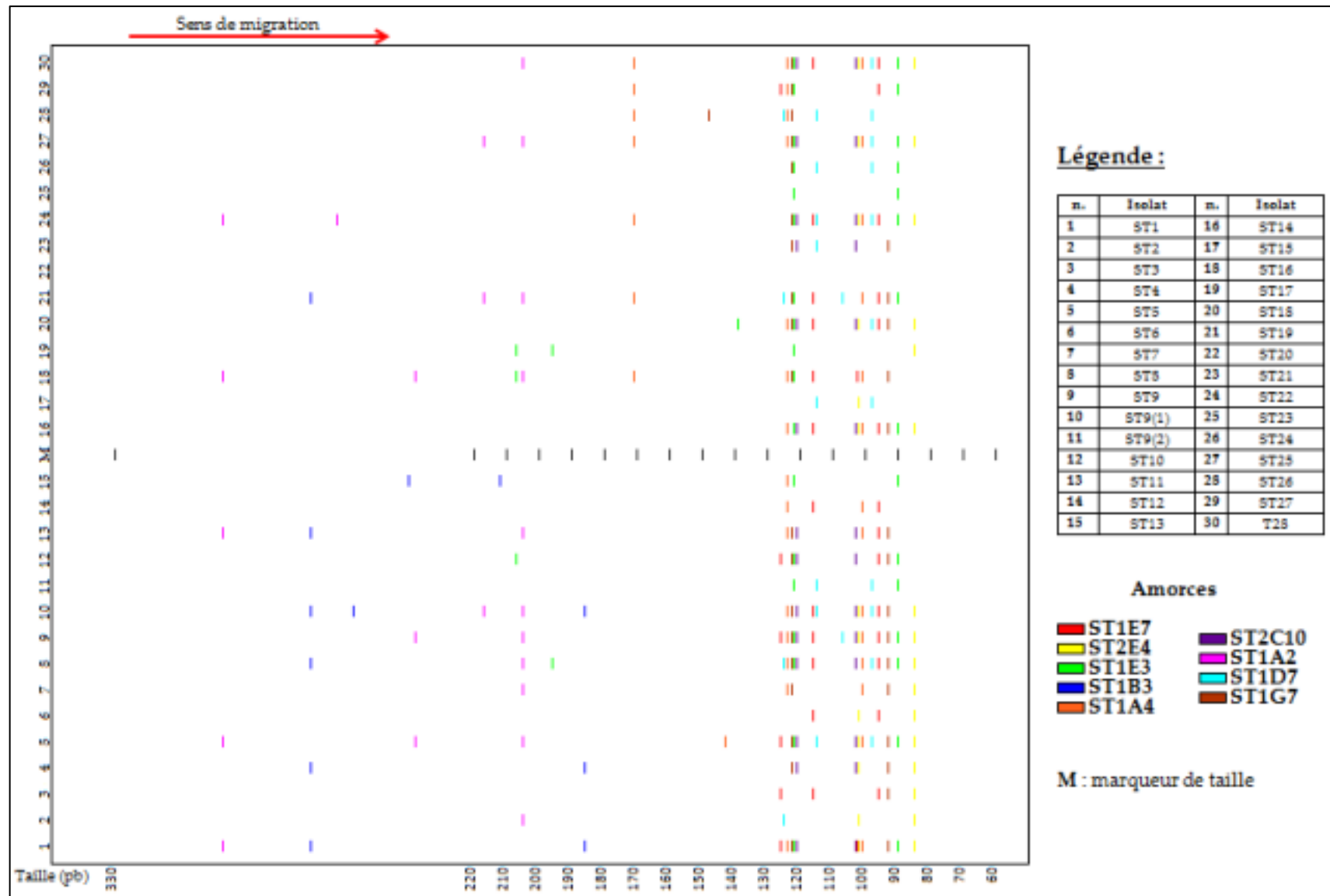


Figure 19 : Schéma récapitulatif de l'ensemble des amplicons révélés sur gel polyacrylamide des 30 isolats de *Z. tritici* avec les neuf amorces SSR

La diversité génétique de la population a été calculée pour tous les marqueurs SSR. La diversité génétique moyenne est de 0,576, allant de 0,302 à 0,943. La valeur la plus élevée est notée au niveau de l'amorce ST1B3 et la plus faible valeur est observée pour l'amorce ST1G7 (Tab. 14). Les 29 isolats qui ont amplifié présentent 29 haplotypes différents.

Tableau 14 : Température optimale d'hybridation, intervalle de taille des fragments et le nombre d'allèles détectés en utilisant neuf amorces microsatellites

Amorce	Motif répété	T° optimale d'hybridation (°C)	Intervalle de taille des fragments (pb)	Nombre d'allèles	Nombre d'isolats avec allèle nul	Diversité génétique (H)
ST1E7	(CGG) ₅	59	96-126	4	13	0,580
ST2E4	(GGC) ₅	61	85-102	2	12	0,495
ST1E3	(CGG) ₅	55	90-207	5	11	0,331
ST1B3	(CGG) ₈	45	186-270	5	22	0,943
ST1A4	(GGC) ₇ /(GGT) ₂	47	101-171	4	11	0,440
ST2C10	(AGCGG) ₄	63	103-121	2	15	0,534
ST1A2	(AGCGG) ₄	51	205-297	5	16	0,804
ST1D7	(AC) ₂₂	55	98-125	4	14	0,756
ST1G7	(TG) ₉	59	93-148	3	8	0,302

La similarité des isolats sur la base du dendrogramme issu de l'analyse avec le logiciel N-TSYS et le coefficient « Dice » à une valeur de 0,29 révèle cinq groupes homogènes (Fig. 20). L'analyse ACP (analyse en composante principale) réalisée avec le même logiciel confirme le regroupement en cinq groupes de l'ensemble des isolats (Fig. 21 et 22).

Le premier groupe encerclé en rouge sur la figure de l'ACP est constitué de deux sous-groupes : Sous-groupe 1 : ST1d, ST5d, ST8t, ST9d et St14d, ST18d, ST22d, ST25t, ST28d, ST9(1)d, ST19d, ST7d, ST11d, ST16d, ST10d, ST27t, ST4d et ST21t ; Sous-groupe 2 : ST3d, ST6t et ST12d. Le deuxième groupe, encerclé en bleu, est constitué de ST9(2)d, ST13d, ST23t et ST24t. Le troisième groupe est constitué des isolats ST15d et ST26d (encerclé en vert). Les isolats ST2t et ST17t sont séparés des autres groupes.

Les isolats ST25t et ST28t ainsi que ST24t et ST9(2)d, présentent des similarités élevées d'après l'arbre de la classification hiérarchique.

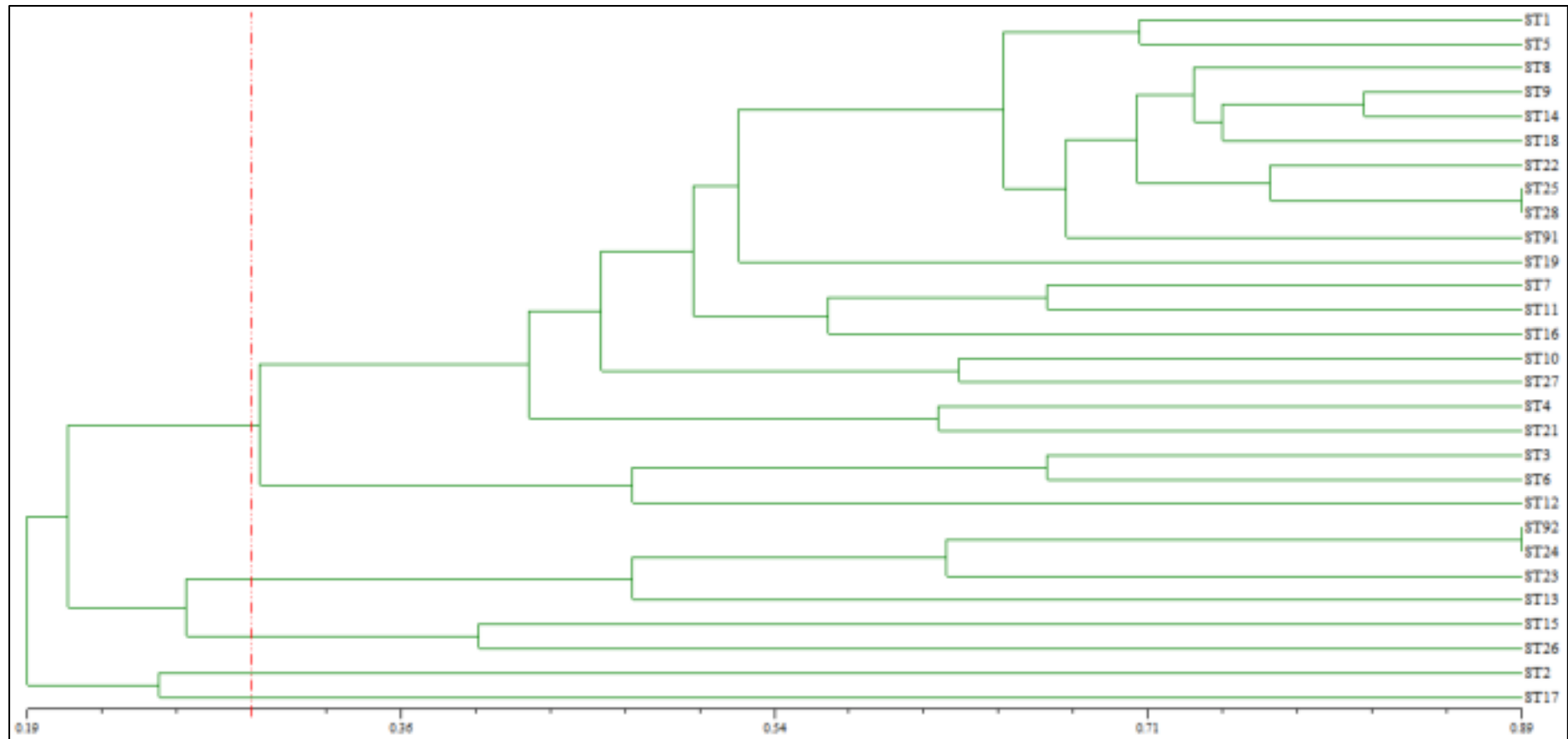


Figure 20 : Dendrogramme représentant les relations génétiques entre les 29 isolats de *Zymoseptoria tritici* en fonction des neuf amorces testées (selon le coefficient « Dice »)

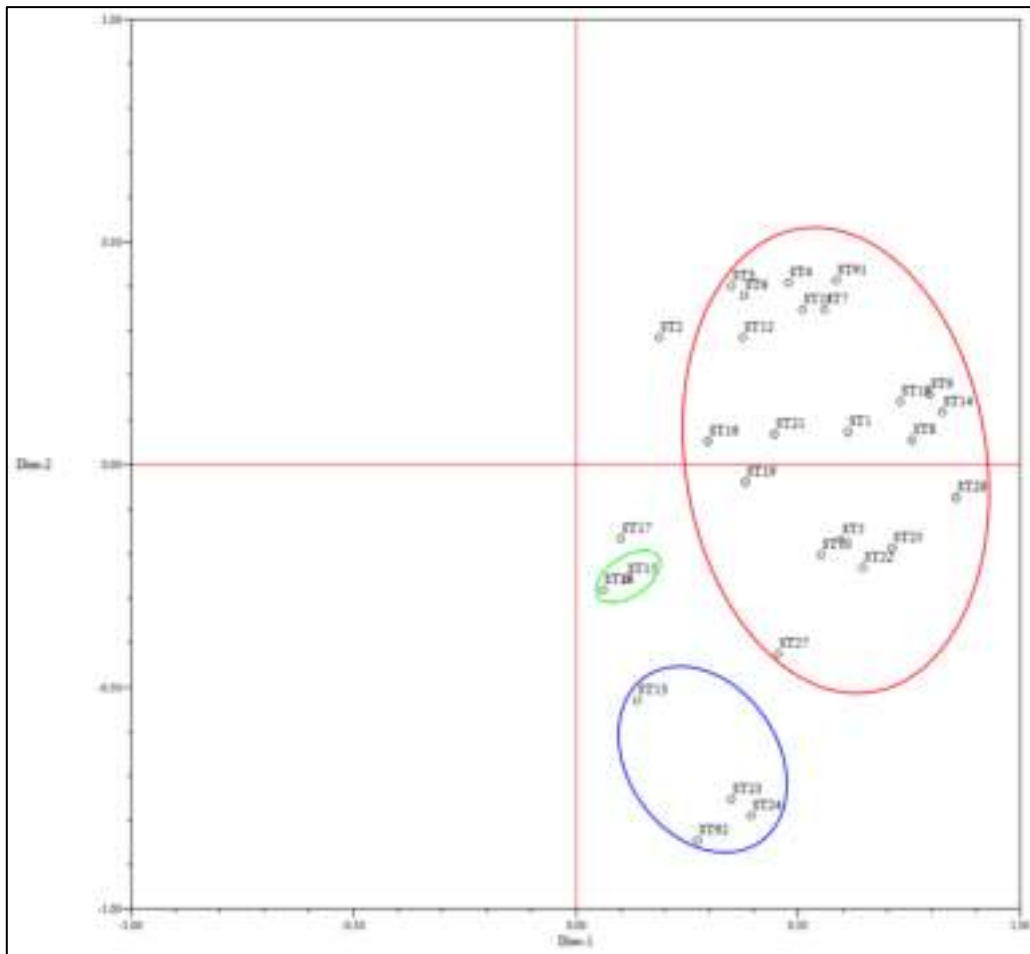


Figure 21 : Analyse en Composantes Principales des 30 isolats en fonction de l'amplification des 9 amorces SSR, en deux dimensions

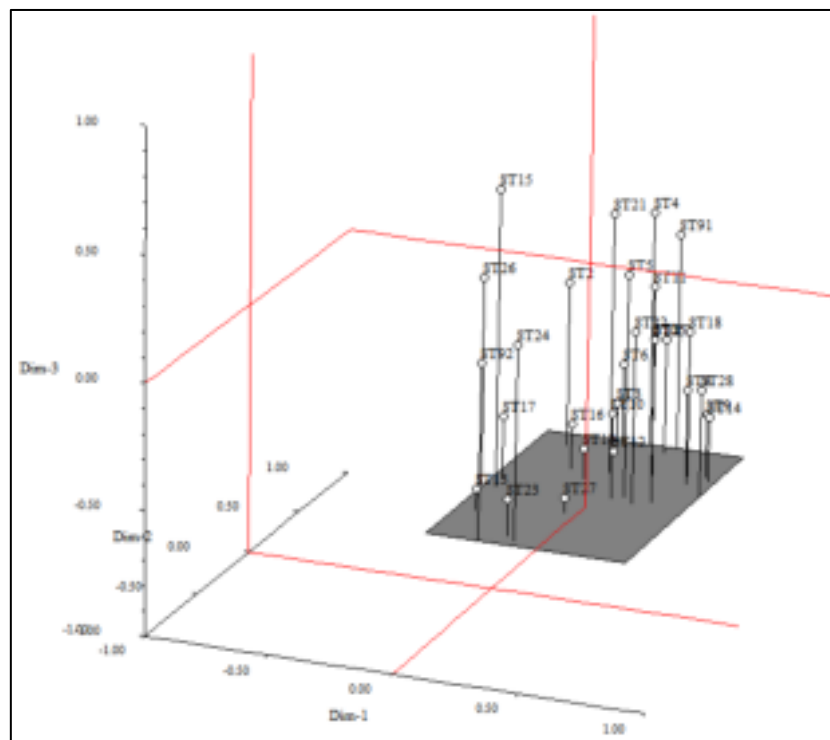


Figure 22 : Analyse en Composantes Principales en trois dimensions

5. Recherche et caractérisation de la forme parfaite *M. graminicola*

Sur les cinq champs prospectés de la Wilaya de Constantine, les chaumes d'un seul champ ont présenté des symptômes caractéristiques du téléomorphe et ont servi pour l'étude.

La caractérisation des pseudothèces, asques et ascospores de *M. graminicola* est réalisée sous microscope équipé d'un appareil photo numérique et un micromètre.

Les pseudothèces trouvés sur les chaumes de blé et récupérés le 21 novembre 2015 puis observés au microscope ressemblent à ceux de *M. graminicola* décrits par Sanderson (1972).

Les appareils sporifères de reproduction sexuée sont de couleur brun foncé, circulaire (Fig. 23 [A, B]), légèrement immergés dans les tissus de la gaine dont la taille varie de 68 à 117 μm (Tab. 15 ; Fig. 23 [C]). Les asques ont une moyenne de 36,73 μm de long et 12,11 μm de large contenant 8 ascospores avec une paroi à double membrane. Ces ascospores sont bicellulaires, de forme elliptique, hyalines et de tailles variables (Tab. 15 ; Fig. 23 [D, E]).

La culture des ascospores sur milieu YMA⁺ a donné des colonies avec l'aspect d'une culture de levure (yeast-like) typique de *Z. tritici* (Fig. 23 [F]). L'observation microscopique montre des conidies filiformes, hyalines, de 2 à 4 cloisons (Fig. 23 [G]).

Tableau 15 : Dimensions (μm) des pseudothèces, asques et ascospores de *Mycosphaerella graminicola* comparées avec des données bibliographiques

	Nos observations		Données de la littérature		
	Intervalle	Moyenne (n=50)	Sanderson, 1972	Halama, 1996	Hoorne <i>et al.</i> 2002
Pseudothèces	68 - 117	97,55±6,65	76-80 ^a × 77-100 ^b	92 - 112	110 - 130
Asques	33,5-48 ^a ×10.5-13 ^b	36,73±3,71 ^a 12,11±0,55 ^b	34-41 ^a × 11-13 ^b	32-36 ^a ×10-14 ^b	~ 42
Ascospores	9-14 ^a ×2-3 ^b	12,09±0,95 ^a ×2 ,92±0,23 ^b	10-15 ^a × 2.5-3 ^b	14-18 ^a × 4-5 ^b	8-10 ^a × 2-2.5 ^b

^a : Longueur

^b : Largeur

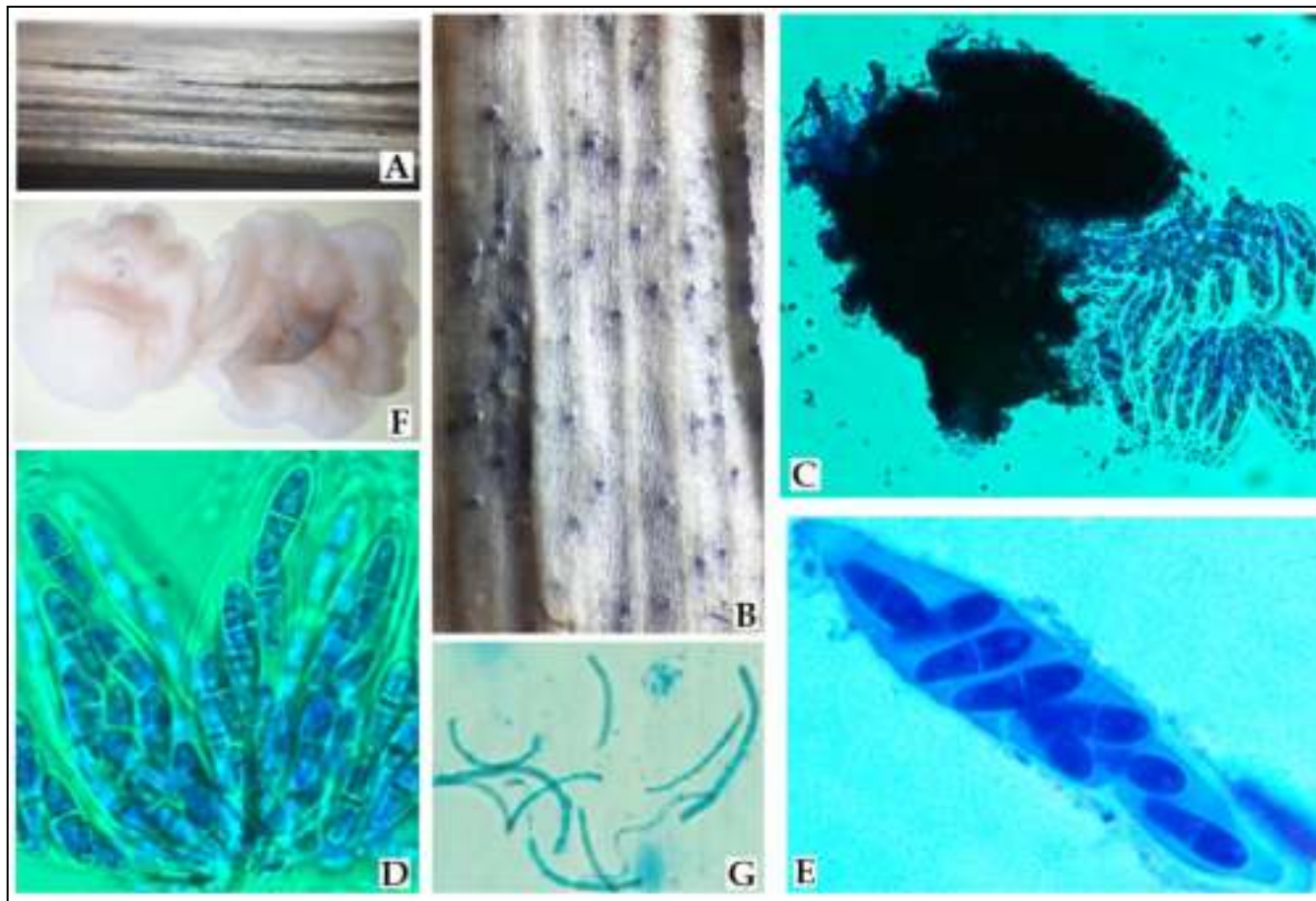


Figure 23 : Structure du télémorphe et de l'anamorphe de *M. graminicola* (*Z. tritici*)

(A et B) : Chaume de blé présentant des pseudothèques de *M. graminicola* ($\times 10$; $\times 40$) ; (C) : Pseudothèque écrasées avec des asques de *M. graminicola* ($\times 200$) ; (D) : Asques et ascospores de *M. graminicola* ($\times 1000$) ; (E) : Asque contenant huit ascospores ($\times 1000$) ; (F) : Colonies rosâtres (yeast-like) de *Z. tritici* ; (G) : Conidies de *Z. tritici* ($\times 1000$).

6. Méthodes de lutte contre *Z. tritici*

6.1. Effet de la fertilisation azotée et potassique

Les effets des modalités de fertilisation se sont révélés à partir du stade montaison où la progression verticale de la maladie « PV » et le recouvrement pycnidial « RP% » de la modalité 3 (apport d'engrais composé de fond + apport d'engrais azoté de couverture) sont respectivement de 4,5 et 45%. Pour la modalité 4 (modalité 3 + apport foliaire à base de potassium au stade montaison) ils sont de 4 et 40%.

Au stade remplissage du grain, la modalité 3 se distingue par la sévérité de la maladie avec un RP% de 70% et un niveau de PV avoisinant 8,5, cela se traduit par la progression de la maladie jusqu'à la feuille drapeau. Les pulvérisations foliaires de solution à base de potassium au stade 1 à 2 nœuds de la modalité 4 semblent avoir un effet limitant de l'agressivité de la maladie sur la dernière feuille, en effet, le RP% est de 47,50%, ce qui a induit une différence claire entre les indices d'attaque moyen « IAM » des deux modalités 3 (60,49) et 4 (26,75).

L'analyse de la variance des notations effectuées au stade plein tallage, n'a pas révélé d'effet significatif de la fertilisation pour les paramètres étudiés (nombre de feuilles atteintes « NFA », PV, RP% et IAM), sauf pour le nombre de lésions par feuilles « NL » dont l'effet est très hautement significatif. Au stade montaison, les modalités de fertilisation ont eu des effets significatifs sur tous les paramètres estimés (Annexe 2).

Le stade remplissage du grain est caractérisé par l'apparition sévère de la maladie sur la dernière feuille au niveau de la modalité 3. L'apport foliaire de potassium au niveau de la modalité 4, a permis une réduction de 14% des pertes de rendement, à ce stade l'effet de la fertilisation est très hautement significatif pour tous les paramètres (Tab. 16).

Tableau 16. Evaluation de la maladie selon les modalités de fertilisation et les stades de culture

MODALITES	STADE DE NOTATION				
	Plein tallage				
	NFA	NL	PV	RP%	IAM
Modalité 1	2,50	2,50 ^b	2,25	28,75	4,32
Modalité 2	1,50	1,50 ^c	1,50	18,75	1,22
Modalité 3	2,75	3,25 ^a	1,75	35,00	2,14
Modalité 4	2,50	3,25 ^a	1,75	25,00	3,28
	Montaison				
	NFA	NL	PV	RP%	IAM
Modalité 1	4,00 ^b	1,75 ^b	3,00 ^b	7,50 ^b	0,51 ^b
Modalité 2	1,00 ^c	1,25 ^b	1,75 ^c	5,00 ^b	0,14 ^b
Modalité 3	4,50 ^a	5,50 ^a	4,50 ^a	45,00 ^a	23,43 ^a
Modalité 4	3,25 ^{bc}	5,25 ^a	4,00 ^a	40,00 ^a	19,39 ^a
	Remplissage du grain				
	NFA	NL	PV	RP%	IAM
Modalité 1	4,25 ^b	1,50 ^c	3,50 ^b	3,75 ^c	0,66 ^c
Modalité 2	1,25 ^c	0,50 ^c	1,75 ^b	1,25 ^c	0,12 ^c
Modalité 3	7,50 ^a	7,25 ^a	8,50 ^a	70,00 ^a	60,49 ^a
Modalité 4	3,75 ^b	4,25 ^b	8,50 ^a	47,50 ^b	26,75 ^b

NFA : Nombre de feuilles atteintes ; NL : Nombre de lésion par feuille ; H : Progression verticale de la maladie ; P : Recouvrement pycnidial ; IAM : Indice d'attaque moyen

Le meilleur rendement estimé est noté au niveau de la modalité 4 avec 63,79 q/ha, les modalités sans apport azotés en couverture (1 et 2) ont révélé les rendements les plus faibles.

L'analyse de la variance montre un effet très hautement significatif du facteur modalité de fertilisation sur le rendement estimé en grain (Annexe 2). Le test de la PPDS permet de distinguer quatre groupes homogènes (Tab. 17).

Tableau 17 : Valeurs moyennes du rendement estimé en grain selon les modalités de fertilisation

Modalités	Rendement estimé (q/ha)
Modalité 1	20,96 ^d
Modalité 2	37,81 ^c
Modalité 3	55,80 ^b
Modalité 4	63,79 ^a

6.2. Lutte chimique

Les résultats de l'évaluation de l'effet des quatre matières actives testées sur la croissance des six isolats de *Z. tritici* les plus virulents de la gamme (Fig. 24) sont décrits ci-après.

6.2.1. Propiconazole

Les résultats de la croissance des isolats de *Z. tritici* en présence des six doses du propiconazole ont eu un effet inhibiteur sur les isolats ST6t, ST9d et ST21t. L'isolat le moins inhibé est le ST17t avec une croissance de 65,83%. La dose la plus efficace est aussi la plus élevée ; D1 (100 mg/l).

L'analyse de la variance à deux facteurs révèle un effet très hautement significatif de la matière active « propiconazole » sur la croissance de *Z. tritici*, cela, en fonction de l'interaction dose et de l'isolat dont l'effet des isolats est très hautement significatif (Annexe. 3).

Le test de Tukey révèle l'existence de deux groupes homogènes pour les isolats. Le groupe « a » renferme les isolats ST4d, ST7d et ST17t dont le taux de croissance varie de 51,66 à 65,83%, ce qui laisse à suggérer que ces isolats ont développé une résistance vis-à-vis de cette matière active ; tandis que le groupe « b » représenté par ST21t, ST9d et ST6t et avec le taux le plus faible de croissance soit 0% chez le ST21t (Fig. 25).

Le paramètre « dose de la matière active » est divisé aussi en deux groupes homogènes, les six doses testées de « propiconazole » ont eu, statistiquement, le même effet sur la croissance des isolats testés, groupe « a » (Tab. 18 ; Fig. 26).

6.2.2. Epoxyconazole

L'époxyconazole a eu un effet inhibiteur sur la totalité des isolats. Le taux de croissance des colonies est entre 0 et 69,16%, l'isolat ST7d a montré le taux de croissance le plus élevé. Les doses D1, D2 et D3 sont les plus efficaces avec une inhibition de croissance qui varie entre 87,5 et 91,67%.

L'analyse de la variance à deux facteurs de l'effet de l'« epoxyconazole » sur la croissance de *Z. tritici* en fonction de l'interaction du paramètre « isolat » et du paramètre « dose de matière active » montre un effet très hautement significatif. L'effet des isolats est très hautement significatif (Annexe. 3).

Le test de Tukey révèle l'existence de trois groupes homogènes pour le facteur isolat et un seul pour le paramètre dose (Tab. 18).

La majorité des isolats sont dans le troisième groupe (groupe c) excepté le ST17t qui représente le groupe « b » avec une croissance de 30,83% et le ST7d le groupe « a » (Fig. 25).

Par ailleurs, la classification en groupes homogènes du facteur « dose de matière active » montre un groupe « b » comportant toutes les doses (le groupe « a » représente le témoin). Le taux de croissance le plus élevé enregistré est de 24,16% avec D5 et D6, c'est les doses les moins efficaces (Fig. 26).

6.2.3. Tébuconazole

L'estimation de la croissance des isolats de *Z. tritici* a révélé l'effet inhibiteur du tébuconazole sur les isolats ST6t, ST9d, ST21t et ST4d, cela pour la totalité des doses testées. La croissance des isolats ST7d et ST17t a été très peu inhibé par cette matière active, ce qui laisse à suggérer que ces deux isolats ont développé une résistance vis-à-vis de cette matière active.

L'analyse de la variance à deux facteurs révèle un effet très hautement significatif de la matière active « tébuconazole » sur la croissance des isolats de *Z. tritici* en fonction de l'interaction des isolats et doses de matière active. L'effet des doses est hautement significatif et celui des isolats est très hautement significatif (Annexe. 3).

Le test de Tukey révèle l'existence de deux sous-ensembles pour les isolats ; le groupe « b » est constitué de ST6t, ST9d, ST21t et ST4d, ces isolats présentent les taux de croissance les plus faibles soit 0% ; tandis que le sous-ensemble « a » comporte le taux de croissance le plus élevé (95%) enregistré chez ST7d et ST17t (Fig. 25). Le paramètre « dose de matière active » présente deux sous-ensembles et un groupe intermédiaire, le groupe « a » est composé des doses D3 à D6 qui présente le plus

haut taux de croissance. Le groupe « a » est représenté par D1 et le groupe intermédiaire par la dose D2 (Tab. 18 ; Fig 26).

6.2.4. Trifloxystrobine

Le trifloxystrobine a eu un effet inhibiteur sur la croissance des isolats ST6t, ST9d, ST21t et ST4d dont le taux de croissance est entre 0 et 38,33%. La matière active n'a pas eu d'effet inhibiteur sur la croissance des isolats ST17t et ST7d (91,66 et 100%).

Pour le « trifloxystrobine », l'analyse de la variance montre un effet très hautement significatif de l'interaction des deux paramètres « isolats » et « doses » sur la croissance de *Z. tritici*. L'effet des doses est hautement significatif et celui des isolats est très hautement significatif (Annexe. 3).

Le test de Tukey révèle l'existence de quatre groupes homogènes concernant le facteur « isolats » (Fig. 25); le groupe « a » est constitué de ST17t et ST7d dont les valeurs sont respectivement de 91,66% et 100% ; le deuxième sous-ensemble regroupe le ST4d, le groupe « c » est composé de ST6t et le groupe « d » représente les isolats ST9d et ST21t avec le plus faible taux de croissance (0%).

Le facteur dose de matière active (Fig. 26) présente trois sous-ensembles et un groupe intermédiaire (D2, D3 et D4), le premier constitué de D5 et D6 et le second par la dose D1 de « trifloxystrobine » qui est la plus efficace (Tab. 18).

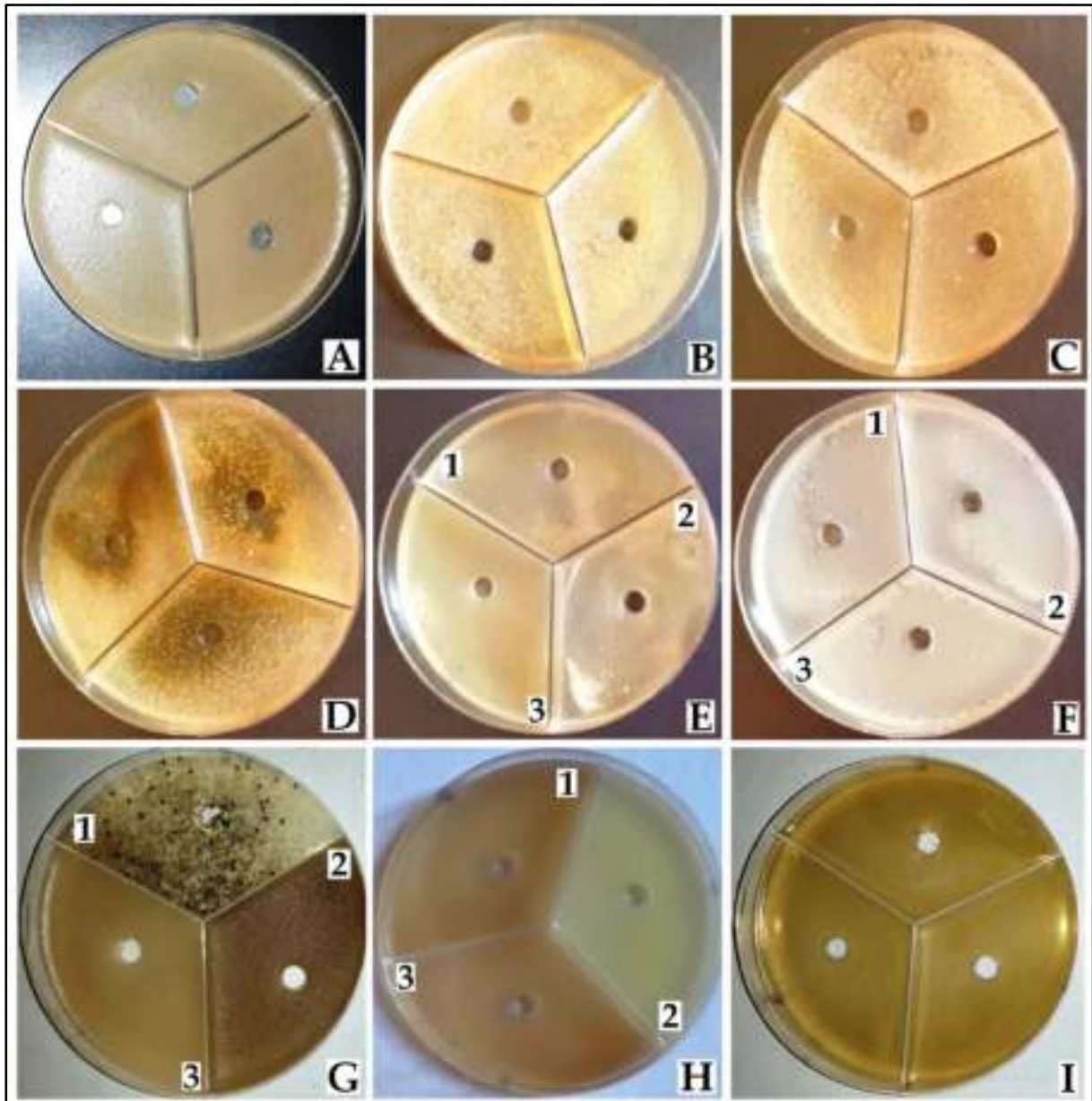


Figure 24 : Différents taux de croissance des isolats de *Z. tritici* en fonction des matières actives fongicides

A : 100% ; **B :** 85% ; **C :** 70% ; **D :** 60% ; **E :** (1 et 2) 20%,(3) 100% ; **F :**(1 et 2) 70%, (3) 80% ; **G :** (1)100%, (2) 80% et (3) 40% ; **H :**(1 et 3) 100%, (2) 0% ; **I :** 0%.

Tableau 18 : Taux de croissance des isolats de *Z. tritici* (%) par matière active

		Matières actives			
		Propiconazole	Epoxyconazole	Tébuconazole	Triflouxystrobine
Isolats (moyenne de croissance sur l'ensemble des doses)	ST4	51,66 ^a	0,00 ^c	6,66 ^b	38,33 ^b
	ST6	1,66 ^b	1,66 ^c	0,00 ^b	13,33 ^c
	ST7	61,66 ^a	69,16 ^a	95,00 ^a	100,00 ^a
	ST9	0,83 ^b	0,00 ^c	0,00 ^b	0,00 ^d
	ST17	65,83 ^a	30,83 ^b	95,00 ^a	91,66 ^a
	ST21	0,00 ^b	0,00 ^c	0,00 ^b	0,00 ^d
Doses (moyenne de croissance sur l'ensemble des isolats)	D1	19,16 ^b	8,33 ^b	26,66 ^c	35,83 ^c
	D2	25,00 ^b	10,83 ^b	30,83 ^{bc}	37,50 ^{bc}
	D3	25,00 ^b	12,50 ^b	34,16 ^b	38,33 ^{bc}
	D4	31,66 ^b	21,66 ^b	35,00 ^b	40,83 ^{bc}
	D5	35,00 ^b	24,16 ^b	35,00 ^b	45,00 ^b
	D6	45,83 ^b	24,16 ^b	35,00 ^b	45,83 ^b
	T0	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a

Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents.

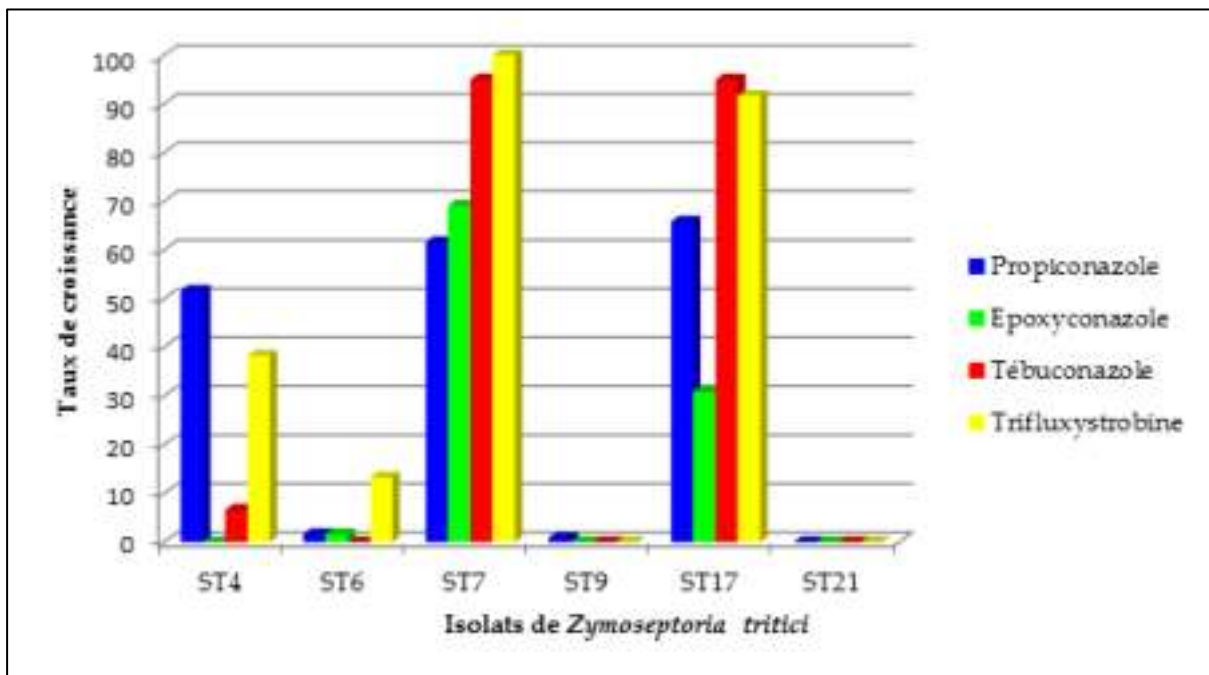


Figure 25 : Taux de croissance des isolats de *Z. tritici* en fonction des matières actives fongicides

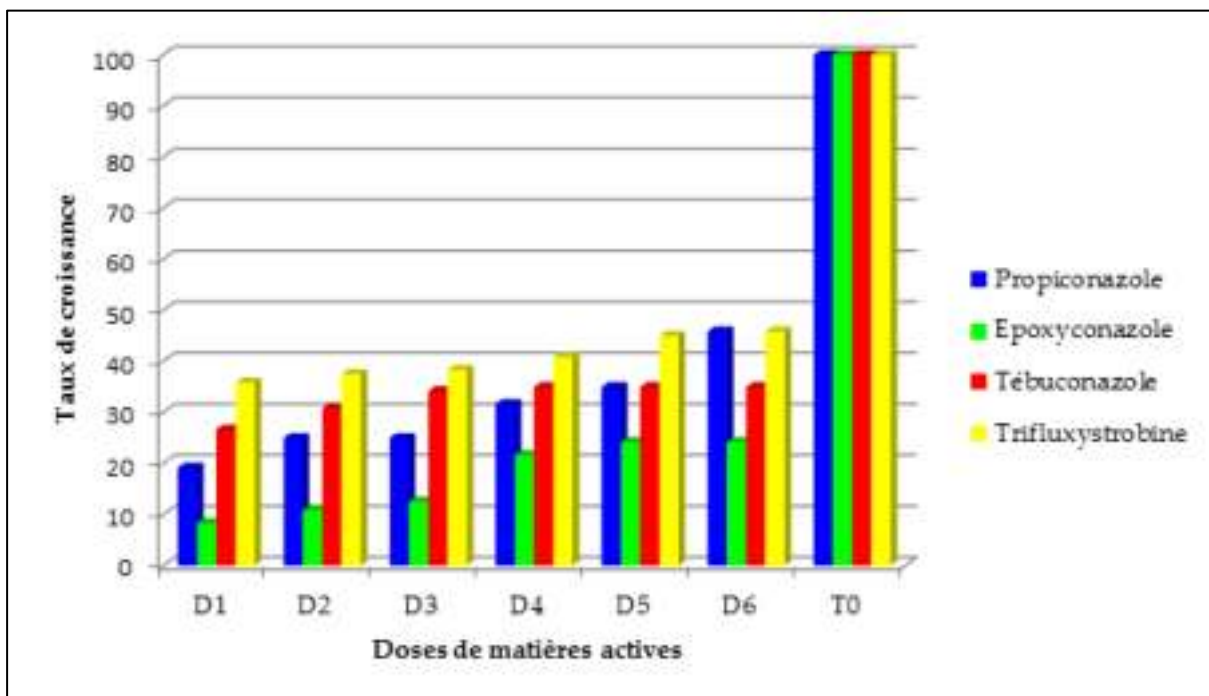


Figure 26 : Taux de croissance des isolats de *Z. tritici* en fonction des doses des matières actives fongicides

6.3. Lutte biologique à l'aide de *Trichoderma sp.*

Les taux de croissance des isolats de *Z. tritici* montrent le potentiel antagoniste du filtrat de l'isolat Tr1 (*T. asperelloides*), ce filtrat a eu un effet inhibiteur sur la croissance, surtout, des isolats ST6t, ST21t et ST17t de *Z. tritici* (0%). La croissance des isolats ST4d, ST9d et ST7d n'a pas été très influencée par les filtrats des isolats de *T. asperellum* (Tr2, Tr3 et Tr4) puisque des croissances entre 80 et 100% ont été enregistrées.

L'analyse de la variance à deux facteurs (isolats de *Z. tritici* et les filtrats des isolats de *Trichoderma*) a révélé un effet très hautement significatif de l'effet antagoniste des filtrats des isolats de *Trichoderma sp.* (*T. asperelloides* et *T. asperellum*) sur les isolats testés de *Z. tritici* (Fig. 25). Le classement en groupe homogène (test de Tukey) montre que l'isolat le plus résistant est le ST4d, avec un taux de croissance globale de 92%, vis-à-vis des quatre isolats de *Trichoderma* (Annexe 4). Pour les isolats de *Trichoderma sp.*, le filtrat qui s'est révélé le plus antagoniste est celui du Tr1 avec un taux d'inhibition sur l'ensemble des isolats de *Z. tritici* de 75 (Tab. 19; Fig. 28). Les quatre *Trichoderma* sont classés en deux groupes homogènes et trois groupes intermédiaires, le filtrat du Tr1 étant le groupe a.

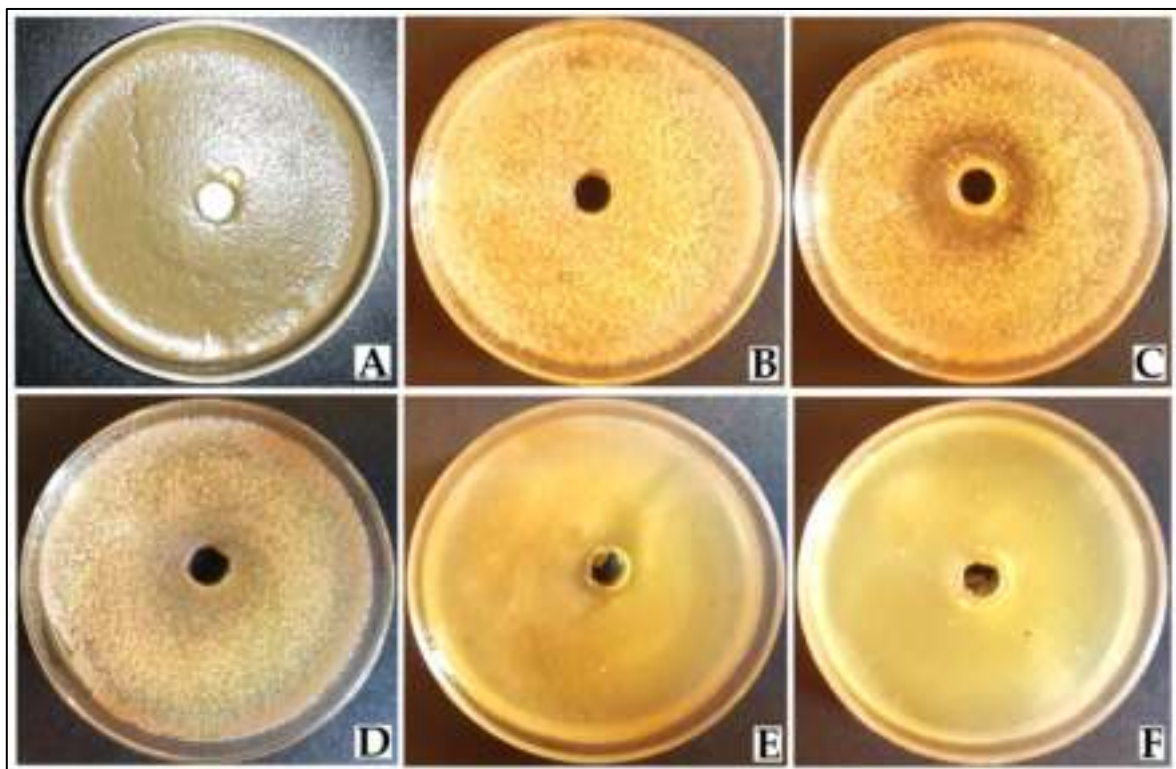


Figure 27 : Différents taux de croissance des isolats de *Z. tritici* en présence des filtrats d'isolats de *Trichoderma*

A : 100% ; B : 90% ; C : 80% ; D : 60% ; E : 20% ; F : 5%

Tableau 19 : Taux de croissance des isolats de *Z. tritici* en présence des filtrats des Isolats de *Trichoderma sp.*

Isolats	Tr1	Tr2	Tr3	Tr4	T0	Groupes homogènes <i>Z. tritici</i>
ST4d	70	90	100	100	100	92 ^a
ST6t	0	0	0	0	100	20 ^c
ST9d	20	100	100	100	100	84 ^{ab}
ST21t	0	0	50	0	100	30 ^c
ST7d	60	100	100	80	100	88 ^a
ST17t	0	0	80	0	100	36 ^{bc}
Groupes homogènes <i>Trichoderma sp.</i>	25,0^a	48,3^{bc}	71,7^{cd}	46,7^{bc}	100,0^d	

Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents.

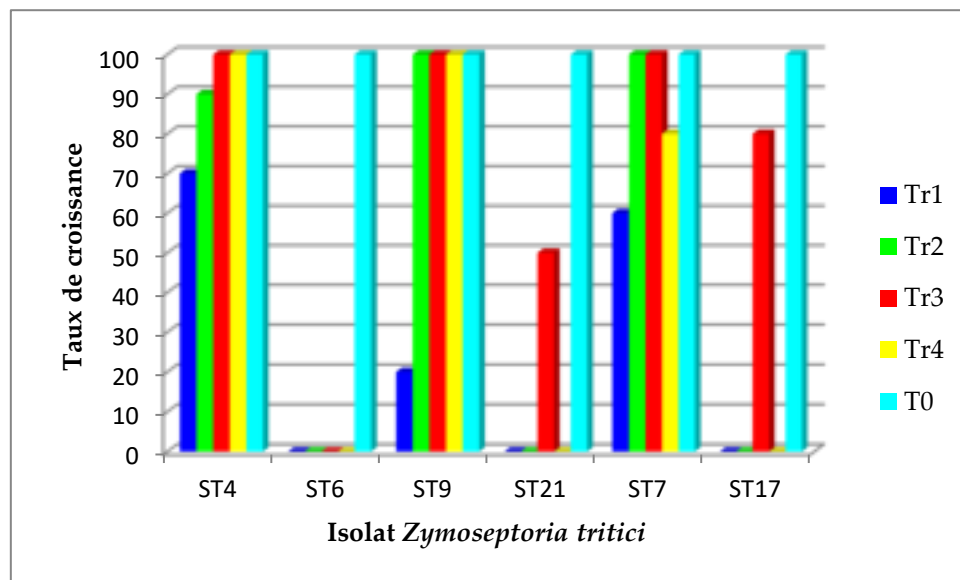


Figure 28 : Taux de croissance de *Z. tritici* en fonction des filtrats d'isolats de *Trichoderma*

Discussion des résultats

1. Occurrence et sévérité de la tache septorienne en Algérie

Les résultats des prospections montrent une large distribution de la tache septorienne dans les régions céréalières du pays, soit 59% des champs sont attaqués sur l'ensemble des champs prospectés.

La différence de sévérité de la maladie entre les campagnes considérées est relativement liée aux conditions climatiques des zones prospectées. Il est admis que le développement des maladies est lié aux conditions climatiques, particulièrement, l'humidité et la température. Au cours des prospections, nous avons noté que la présence et la sévérité de la maladie dans les régions subhumides est particulièrement observée dans les Wilayate d'Alger, d'Annaba et de Blida et varie selon l'échelle « double digit » pour atteindre 98 et 99. Selon les données climatiques (**source ONM**) de l'année 2010, la Wilaya d'Annaba, a enregistré une pluviométrie de 596 mm, avec une pluviométrie des quatre premiers mois de la même année de 237 mm (**source ONM**), cette période est déterminante pour le développement de la maladie.

L'année 2011 a été caractérisée par une pluviométrie de 673 mm dans la Wilaya d'Alger, il a été enregistré 314 mm durant les quatre premiers mois (**source ONM**) avec des températures moyennes entre 17 et 20°C, ce qui a permis à la maladie de la tache septorienne de se manifester.

Cependant, nous avons également noté que dans certaines Wilayate de la région semi-aride, particulièrement Constantine et Tiaret. Une sévérité importante de la maladie est observée, qui peut être expliquée par la particularité de l'Algérie, où la céréaliculture est dominante dans un système de monoculture dans les régions semi-aride plus que dans les Wilayate subhumides où les cultures sont plus diversifiées.

Dans les régions où la sécheresse a fait des dégâts durant la campagne de 2011, la maladie ne s'était manifestée que sur les premières feuilles. En effet, les résultats notés indiquent que la sévérité de la maladie ne dépasse pas (11) selon l'échelle « double digit ». C'est le cas des Wilayate de Saïda et de Mascara dont la somme des précipitations des quatre premiers mois ne dépassait pas les 130 mm (**source ONM**).

Selon Cowger *et al.* (2000) et Danon *et al.* (1982), cette maladie engendre des pertes de rendements majeures en particulier lorsque les pluies printanières persistent, après l'émergence de la feuille drapeau. Ces pertes varient avec les conditions climatiques, les variétés cultivées et la précocité des attaques (Devale *et al.*, 2000).

2. Caractérisation morphologique de l'agent causal de la tache septorienne : *Z. tritici*

Les observations phénotypiques des colonies issues des isolements de *Z. tritici* sur milieu solide YMA âgées de 10 jours, montrent une grande diversité de texture et de couleur. Les isolats de couleur rosâtre ont une texture crémeuse (Yeast-Like), qui peut couvrir entièrement le milieu de culture ou sous forme de colonies qui suivent les lignes d'ensemencement. Les isolats de couleur sombre sont solides et compacts (en forme de bourrelet stromatique). La couleur rose est la plus dominante soit 74,08%.

Ces résultats concordent avec ceux rapportées par Bentata *et al.* (2011) au Maroc, de Hattab-Touati (2005) et Ayad *et al.* (2014) pour les isolats algériens, qui ont réalisé une caractérisation culturelle de *Z. tritici*, ou encore, ceux de Siah *et al.* (2008) sur la distribution des mating types selon le phénotype des colonies d'isolats français. Selon Quaedvlieg *et al.* (2011) des variants de *Z. tritici* peuvent apparaître sur milieu de culture.

3. Agressivité des isolats de *Z. tritici* et évaluation du comportement variétal

Les résultats obtenus pour ce test révèlent que l'interaction plante-pathogène est très hautement significative. Les isolats ST4d, ST9d, ST17d et ST21t sont les plus agressifs sur la gamme d'hôte testée selon les deux paramètres étudiés à savoir le nombre de feuilles infectées et le pourcentage de recouvrement pycnidial.

L'existence d'une variation qualitative de la virulence chez *M. graminicola* a été signalée dans certaines études (Eyal *et al.*, 1973 ; Kema *et al.*, 1996 ; Saadaoui, 1987). Les travaux de Brading *et al.* (2002) et Kema *et al.* (2000) ont apporté la preuve d'une relation de gène-pour-gène chez le pathosystème blé - *M. graminicola*.

L'étude de **Medini et Hamza (2008)** a montré que les isolats algériens disposent de plus de variabilité, avec 8 pathotypes, par rapport aux isolats tunisiens et canadiens. La forte variabilité des isolats algériens peut être liée aux pratiques agricoles. En effet la proportion des cultures des deux espèces de blé (tendre et dur) est de même importance (**MADR, 2014**). Par conséquent, *M. graminicola* est exposé à un large éventail de génotypes hôtes ayant différentes sources de gènes de résistance.

La spécialisation physiologique est clairement démontrée, puisque 10 isolats sur 26 étudiés montrent une spécificité physiologique pour le blé tendre ou le blé dur.

Kema et al. (1996b) suggère l'existence de deux variants de *M. graminicola*, l'un adapté au blé dur et l'autre au blé tendre. L'hypothèse de l'existence d'une spécificité dans le pathosystème blé - *M. graminicola* a été émise depuis le premier rapport indiquant une spécialisation physiologique (**Eyal et al., 1973**).

Selon plusieurs auteurs, les isolats de *Z. tritici* obtenus à partir des blés tétraploïdes montrent une plus grande virulence sur les blés qu'il soit tétraploïdes ou hexaploïdes (**Kema et al., 1996b ; Van Ginkel et Scharen ,1988**). C'est le cas du ST21t de notre étude. Néanmoins, les isolats les plus virulents de la gamme testée (ST17d, ST9d et ST4d), sont obtenus à partir de blé dur.

Les variétés HD 1220 et Waha se sont révélées les plus sensibles de la gamme des isolats étudiée. Tandis que les variétés les plus résistantes sont Ain abid, Colosseo et Simeto. Ces dernières n'ont présentées aucun symptôme caractéristique de la maladie.

Selon **Ayad et al. (2014)** et **Hattab-Touati (2005)**, les variétés HD1220, Vitron et Waha manifestent une sensibilité à l'égard de la majorité des isolats algériens testés.

Shaner et Finney (1982) ont identifié la résistance variétale à *Z. tritici*. Plus de 12 principaux gènes conférant des niveaux élevés de résistance de l'hôte ont été identifiés. La plupart ont été cartographiés à des régions spécifiques du génome du blé (**Adhikari et al., 2004 ; Arraiano et al., 2007 ; Chartrain et al., 2005 ; McCartney et al., 2002**).

4. Variabilité génotypique de *Z. tritici*

Les résultats de la multiplex-PCR pour la détermination des deux idiomorphes (mat1-1 et mat1-2) confirment l'existence des deux idiomorphes en proportion égale au sein de la population étudiée. Ces résultats concordent donc avec ceux de **Allioui et al. (2014)** et de **Ayad et al. (2014)** qui ont montré que les deux idiomorphes existent en Algérie à fréquence égale, ce qui laisse suggérer l'existence potentielle de la reproduction sexuelle de *M. graminicola* au sein des populations algériennes.

Neuf paires d'amorces microsatellites SSR sont utilisées afin d'étudier la variabilité génétique d'une population de *M. graminicola* issues de 27 champs de blé dans l'Est algérien.

Les résultats montrent l'existence d'un niveau très élevé de variabilité génétique de la population. Les neuf loci sont polymorphes par rapport aux 30 isolats testés. Les amorces ST1E3, ST1B3 et ST1A2 présentent le nombre le plus élevé d'allèles (05). Tandis que ST2E4 et ST2C10 sont les amorces qui présentent le nombre le plus faible d'allèle avec deux allèles seulement. L'amorce ST1G7 révèle le plus haut niveau de polymorphisme avec une diversité génétique de (0,302), ceci est similaire avec les résultats de **Komijani et al. (2010)**.

La diversité génétique obtenue avec les six amorces ST1E7, ST2E4, ST1E3, ST1A4, ST2C10 et ST1G7 varie entre 0,302 et 0,580. Des résultats similaires sont notés par **Owen et al. (1998)** dans leur étude sur la diversité génétique de 12 isolats du Royaume-Uni à l'aide des mêmes amorces que celles utilisées dans notre étude ; la moyenne de la diversité observée étant de 0,49. Nos résultats concordent aussi avec ceux de **Razavi et Hughes (2004)** dont le nombre de loci observés varie de 1 à 5 et la variabilité génétique entre 0,04 et 0,67. De même pour les résultats de l'étude réalisée par **Komijani et al. (2010)** sur la variabilité génétique de 58 isolats iraniens qui s'est située entre 0,25 et 0,62 avec une moyenne de 0,44.

En revanche la diversité génétique obtenue avec les amorces ST1B3, ST1A2 et ST1D7 est respectivement de 0,756, 0,804 et 0,943. Cela est dû au nombre élevé d'isolats avec un nombre d'allèles nul. **Razavi et Hughes (2004)** ont étudié la structure génétique d'une population composée de 90 isolats de Saskatchewan (Canada) en utilisant les mêmes neuf amorces que celles utilisées dans notre étude ; dans l'amorce ST1B3 n'ayant donné aucune bande visible. **Owen et al. (1998)** ont supposés que les

mutations au niveau du site de liaison des amorces sont la cause de l'absence d'amplification.

Une similarité génétique est observée au niveau du dendrogramme basé sur le coefficient de Dice (0,89) entre les isolats ST25t et ST28t et entre ST9(2)d et ST24t. A l'aide des neuf amorces marqueurs SSR, les 29 isolats amplifiés présentent 29 haplotypes (phénotypes moléculaires) différents. Cela indique que la population étudiée ne présente pas de clones. Ce qui suggère que la reproduction asexuée joue un rôle mineur dans la structure génétique de la population. Néanmoins, les isolats ST5d, ST9d, ST22d et ST28t ont présenté des amplifications des mêmes amorces, mais à différents allèles.

Nous notons que les isolats ST9d, ST9(1)d et ST9(2)d qui sont issus du même champ avec ST9d et ST9(1)d obtenus de deux lésions de la même feuille et ST9(2)d d'un autre plant du même champ présentent un polymorphisme élevé ; ST9d et ST9(1)d appartiennent au même groupe contrairement au ST9(2)d qui appartient à un autre groupe selon l'arbre hiérarchique et l'analyse en composantes principales.

Des études antérieures sur la variabilité génétique au sein d'une population d'un même champ, indiquent que cette diversité est plus prononcée au niveau d'un échantillonnage local (40 m²) que dans un échantillonnage à large échelle. Aussi une variabilité génétique considérable est souvent reportée entre les isolats obtenus à partir de deux lésions différentes sur la même feuille ou au sein d'une même lésion (McDonald et Martinez, 1990 ; Boerger *et al.*, 1993 ; Cordo *et al.*, 2006 ; Berraies *et al.*, 2013).

Selon Cordo *et al.* (1990) la présence de la reproduction sexuée induit de nouvelles combinaisons de gènes dans les champs d'une saison à une autre. Cette hypothèse est soutenue par les résultats des parties « Recherche de la forme parfaite et détermination des mating types » de notre présente étude ainsi que les études de Allioui *et al.* (2014) et de Ayad *et al.* (2014) concernant l'étude des deux idiomorphes de *M. graminicola* dans les champs de blé algériens.

5. Recherche et caractérisation de la forme parfaite *M. graminicola*

La recherche de la forme parfaite sur les chaumes des précédents culturaux des champs de la Wilaya de Constantine en novembre 2015 dans la daïra d'El Khroub, a permis de mettre en évidence l'existence de la forme parfaite.

Les pseudothèces observées ressemblent à ceux de *M. graminicola* décrites par **Sanderson (1972)** trouvées sur les chaumes de blé dur. Les mesures réalisées notamment sur les pseudothèces, les asques et ascospores concordent avec ceux décrits par **Sanderson (1972)**, **Halama (1996)** et **Hoorne et al. (2002)**.

L'isolement des ascospores sur milieu YMA⁺ a révélé une culture qui a un aspect d'une culture de levure (yeast-like) typique de *Z. tritici*. L'observation microscopique montre des conidies filiformes, hyalines, de 2 à 4 cloisons. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par **Hoorne et al. (2002)**.

La confirmation de la présence du téléomorphe en Algérie met en évidence les risques d'apparition de souches résistantes aux fongicides et des nouvelles souches qui pourraient surmonter la résistance ou la tolérance variétale conférées par les recombinaisons sexuelles (**Hunter et al., 1999**). En effet *M. graminicola* a un cycle sexuel actif sous des conditions naturelles favorables, il en résulterait une importante diversité génétique des populations (**Kema et al., 1996 ; Zhan et al., 2003**).

Les ascospores sont considérées comme source de l'inoculum primaire pour l'initiation d'épidémies de septoriose (**Shaw et Royle, 1989**). **Linde et al. (2002)** ont indiqué que les ascospores peuvent être transportées par le vent sur des distances pouvant atteindre les 100 km.

La présence du téléomorphe *M. graminicola* était largement supposée, du fait de la large distribution de la tache septorienne dans les régions céréalières algérienne. La présente étude est la première à apporter les preuves concrètes de son existence dans les conditions de plein champ en Algérie, et confirme les hypothèses avancées par **Allioui et al. (2014)** et de **Ayad et al. (2014)**.

6. Méthodes de lutte contre *Z. tritici*

L'étude de l'effet de la fertilisation azotée et potassique sur l'évolution de la tache septorienne en plein champ montre que la sévérité de la maladie est plus prononcée au niveau des plants ayant subi des apports d'engrais azoté. Les résultats obtenus sont similaires à ceux rapportés par plusieurs auteurs (**Leicht et Jenkins, 1994 ; Eyal, 1999 ; Ben Mouhamed *et al.*, 2001**).

Les attaques aux premiers stades de croissance du blé affectent le nombre de talles et la fertilité des épis ainsi que la qualité des grains ; elles détruisent une surface importante des tissus foliaires causant une réduction des potentiels photosynthétiques de la plante. Les attaques au dernier stade de croissance sont les plus graves, ayant pour conséquences, des pertes de la vigueur et de la productivité (**Sharen et Krupinsky, 1978**).

L'augmentation de l'expression de la maladie causée par *Z. tritici* en fonction des doses croissantes d'azote pourrait être expliquée à travers le rôle de l'élément N dans la culture de blé comme un facteur qui engendre à la fois des changements morphologiques et physiologiques au niveau des cellules de l'hôte. En effet l'azote stimule la croissance végétative et il en résulte un potentiel de tallage élevé induisant une augmentation au niveau de la densité de la culture. Dans ce cas l'architecture de la plante accentue le risque d'attaque par des agents pathogènes (**Ben Mouhamed *et al.*, 2001**).

L'attaque sévère au niveau de la dernière feuille pour la modalité 3 a induit des baisses de rendement considérables suite au rôle important de la feuille drapeau dans l'élaboration du rendement. Selon **Auriau *et al.* (1992)**, la majorité des assimilats stockés dans les grains est issue de la photosynthèse post-floraison de la dernière feuille.

Sharma *et al.* (2005) ont noté que le rendement en grain ainsi que le poids moyen du grain augmentent avec l'application d'engrais potassiques avec ou sans applications de fongicides. Les résultats obtenus sont en accord avec **Ben Mouhamed *et al.* (2001)** qui ont testé des apports au sol d'engrais potassiques. **Sharma *et al.* (2005)** ont travaillé sur la relation entre la sévérité de *Septoria nodorum* et le taux de l'élément potassium dans le sol, sont arrivés aux mêmes résultats.

Par conséquent, la fertilisation de la culture influence le développement de la maladie ; le niveau d'infection reflète la teneur en azote d'un sol (**Tompkins et al., 1993**) et lorsque le potassium est déficient, la sévérité de la maladie est plus prononcée que lorsque celui-ci est en teneur adéquate dans le sol (**Shipton et al., 1971**).

Concernant l'essai fongicide comme moyen de lutte, l'analyse statistique de l'effet de quatre matières actives (trois Triazoles et une Strobilurine) sur la croissance de six isolats de *Z. tritici*, choisis pour leur sévérité, a montré que les isolats ST21t, ST6t et ST9d sont les plus sensibles aux différentes matières actives testées. Tandis que les isolats ST7d et ST17d semblent avoir développé une résistance vis-à-vis des molécules testées. L'epoxyconazole a eu un effet inhibiteur sur l'isolat ST4d en plus des autres isolats qui se montrent sensibles. Les matières actives appartenant à la famille des triazoles (DMI) présentent un effet inhibiteur supérieur à la strobilurine (QoI). Comparativement au témoin, l'effet doses est hautement significatif pour les quatre matières actives à l'égard des isolats étudiés.

Stewart et al. (2014) ont réalisé une étude sur la résistance des isolats de *Z. tritici* de Nouvelle Zelande aux fongicides azoxystrobine et epoxiconazole *in vitro* et *in vivo*. Une résistance des isolats à ces deux matières actives est clairement révélée. **Ronis et al. (2015)** ont réalisé une étude similaire sur la résistance des isolats lituaniens aux DMI notamment l'epoxiconazole.

Deux mutations conférant une résistance aux triazoles des isolats de *Z. tritici* ont été identifiées. Ces mutations réduisent l'efficacité des fongicides plutôt que de les rendre complètement inefficaces. Cependant, l'utilisation répétée de fongicides appartenant à la même famille exercera une pression de sélection supplémentaire sur l'agent pathogène et donnera lieu à de nouvelles mutations (**Hollaway, 2014**).

L'isolat Tr1 (*T. asperelloides*) s'est avéré d'un grand potentiel antagoniste. Avec l'inhibition totale de la croissance de trois isolats de *Z. tritici* sur les six testés (0%). Le ST6t est l'isolat qui a été le plus inhibé par l'ensemble des filtrats des *Trichoderma sp.* testés contrairement à l'isolat ST4d.

Plusieurs études sur le biocontrôle du pathogène *Z. tritici* ont mis l'accent sur les antagonistes spécifiques comme un moyen pour lutter contre cette maladie (**Perello' et al., 2001 ; Alippi et al. 2000 ; Nolan et Cooke 2000**).

En effet, différentes espèces de *Trichoderma* ont été largement étudiées, particulièrement pour leur habilité à agir comme agent de biocontrôle (**Haran et al. 1996 ; Harman 2000**). Les *Trichoderma sp.* sont connus pour leurs interaction avec d'autres microorganismes et spécialement avec les champignons, à travers différents modes d'action : métabolites secondaires à effet inhibiteur, mycoparasitisme et compétition. D'autres études ont révélé un effet sur les plantes en induisant des mécanismes de défense naturelle des plantes dicotylédones et monocotylédones contre plusieurs bactéries, champignons et virus phytopathogènes (**Harman, 2004**).

Elias et al. (2016) ont rapporté dans une étude incluant trois isolats de *T. asperellum* et un isolat de *T. asperelloides*, que ces isolats ont un effet antagoniste *in vivo* contre deux agents pathogènes de la laitue *Sclerotinia minor* et *S. sclerotiorum*.

Conclusion générale

Conclusion générale

La tache septorienne du blé causée par *Mycosphaerella graminicola* (=anamorphe *Septoria tritici*) récemment nommé *Zymoseptoria tritici*, est largement répandue dans le monde.

Cette maladie est signalée dans la majorité des régions de production de blé en Algérie. La prévalence et la sévérité de la tache septorienne selon les différentes régions céréalières du nord algérien sont évaluées, avec un accent particulier sur la diversité phénotypique et géotypique des isolats de *Z. tritici* de l'Est algérien.

Les prospections réalisées entre 2010 et 2013 sur des régions céréalières du pays montrent une large distribution de la tache septorienne ; le taux de présence de la maladie sur l'ensemble des champs prospectés est estimé à 59%.

Il est noté aussi, que la différence de la sévérité de la maladie, entre les champs prospectés, est relativement liée aux conditions climatiques des zones concernées. Au cours des prospections, nous avons observé que la présence et la sévérité de la maladie dans les régions subhumides sont particulièrement importantes, c'est le cas des Wilayate d'Alger, d'Annaba et de Blida où la sévérité de la maladie selon l'échelle « double digit » atteint 98 et 99. C'est le cas aussi des Wilayate de Constantine et de Tiaret, de la région semi-aride du pays, où la céréaliculture est pratiquée d'une manière intense et en monoculture, raison de l'importance de la septoriose dans ces zones du pays.

Les observations phénotypiques des colonies de *Z. tritici* issues des isollements sur milieu solide YMA âgées de 10 jours, montrent une grande diversité de texture et de couleur. Les isolats de couleur rosâtre ont une texture crémeuse (yeast-like) et peuvent couvrir entièrement le milieu de culture, ou sous forme de colonies qui suivent les lignes d'ensemencement. Les isolats de couleur sombre sont durs et compacts. Il est à remarquer que la couleur rose est la plus dominante.

Les tests d'agressivité des isolats de la région Est, inoculés sur une gamme variétale de 16 variétés (blé dur, blé tendre et triticale), montrent que les isolats ST9d, ST17d et ST21t sont les plus virulents, avec un maximum de feuilles infectées. Selon le paramètre « taux de recouvrement pycnidial » l'isolat ST4d est comparable aux trois autres isolats.

Sur le plant comportement variétal, les plus sensibles sont HD 1220 et Waha, tandis que les plus résistantes aux isolats testés sont Ain abid, Colosseo et Simeto.

Ces comportements confirment également l'existence d'une spécialisation physiologique ; sur 26 isolats étudiés, 10 montrent une spécificité physiologique pour le blé tendre ou le blé dur.

Sur le plant diversité génotypique du pathogène *M. graminicola*, 30 isolats issus de 27 champs de blé de l'Est algérien sont étudiés à l'aide de neuf paires d'amorces microsatellites SSR (Simple Sequence Repeat). Les résultats montrent l'existence d'un niveau très élevé de variabilité génétique de cette population. Les neuf loci sont polymorphes par rapport aux isolats testés. Les amorces ST1E3, ST1B3 et ST1A2 présentent le nombre le plus élevé d'allèles (05). Tandis que ST2E4 et ST2C10 sont les amorces avec le nombre le plus faible d'allèles (02). L'amorce ST1G7 révèle le plus haut niveau de polymorphisme avec le plus faible indice de diversité ($H=0,302$).

Une similarité génétique est observée au niveau du dendrogramme basé sur le coefficient « Dice » entre les isolats ST25t et ST28t d'une part et entre ST9(2)d et ST24d d'autre part. Ainsi, 29 haplotypes (phénotypes moléculaires) différents sont obtenus. Cela indique que la population étudiée ne contient pas de clones, ce qui suggère l'existence d'une reproduction sexuée avec un rôle majeur dans la structure génétique de la population.

Les résultats sur la recherche des deux mating types (mat1-1 et mat1-2) dans la population de *Z. tritici* par multiplex-PCR, montrent l'existence des deux idiomorphes en proportions relativement égales. Et la première signalisation de la forme parfaite au niveau de la Wilayat de Constantine (El khroub) confirme ces derniers résultats.

La confirmation de la présence du téléomophe en Algérie indique les risques d'apparition de souches résistantes aux fongicides et / ou de nouvelles souches qui surmonteraient les variétés résistantes ou tolérantes, ce qui entraîne une difficulté accrue dans les mesures de lutte pouvant être envisagées.

Dans l'objectif de palier aux effets néfastes d'une lutte exclusivement chimique sur l'environnement, des recherches pour une stratégie de défense en combinant différentes méthodes de lutte a été abordée dans cette étude.

Ainsi, l'essai de l'influence de la fertilisation azotée et potassique sur le développement de la tache septorienne, en plein champ, montre que les apports d'engrais azotés augmentent la sévérité de la tache septorienne causant une diminution des rendements. Par ailleurs, l'azote étant l'élément le plus important dans l'élaboration du rendement, une carence en cet élément peut avoir des conséquences néfastes sur la production. Il est possible d'y remédier à cela par des pulvérisations fractionnées d'engrais potassiques foliaires au stade montaison et épiaison.

L'effet de quatre matières actives fongicides (trois Triazoles et une Strobilurine), sur la croissance de six isolats de *Z. tritici*, choisis pour leur sévérité révélée au niveau du test d'agressivité, a montré que les isolats ST21t et ST9d sont les plus sensibles de la gamme vis-à-vis des différentes matières actives testées. Tandis que les isolats ST7d et ST17d montrent une résistance aux matières actives des deux familles de fongicides testées.

L'utilisation des filtrats de *Trichoderma sp.* sur la croissance de *Z. tritici*, a révélé un grand potentiel de l'utilisation de cet agent antagoniste, particulièrement, l'isolat Tr1 (*T. asperelloides*) dans un éventuel programme de lutte biologique.

En perspective à ce présent travail, il serait intéressant de développer une meilleure stratégie de lutte contre les pertes considérables causées par la tache septorienne sur les rendements des blés, en envisageant les travaux suivants :

- Généraliser l'étude de la diversité génétique de *Z. tritici* à l'ensemble des zones de production des blés pour une meilleure connaissance du pathogène ;
- Rechercher la résistance aux fongicides de *Z. tritici in-vivo* et les gènes mutants liées à la résistance ;
- Etablir un programme de sélection variétale des blés sur la base des variétés qui ont montré une résistance aux isolats de *Z. tritici* présent en Algérie;
- Approfondir la recherche sur les moyens de lutte alternative basés sur l'utilisation de microorganismes antagonistes, tels les *Trichoderma*.

Une meilleure connaissance de l'agent pathogène, de la relation plante-pathogène et des différents moyens de lutte (culturelle, chimique et biologique) permettrait la mise en place d'une stratégie de lutte intégrée efficace contre la tache septorienne du blé.

RESUME

La tache septorienne, *Mycosphaerella graminicola* (anamorphe *Zymoseptoria tritici*), agent causal de la maladie de la tache septorienne du blé peut engendrer des pertes de rendements considérables (35 à 60%) notamment en régions méditerranéenne. Au Maghreb, la septoriose est considérée comme la maladie du blé la plus importante, en Algérie elle est largement présente dans toutes les régions Nord du pays.

Le présent travail est entrepris dans l'objectif d'évaluer la diversité phénotypique et génotypique du pathogène *Z. tritici* en Algérie. Principalement, la prévalence de la maladie ; l'agressivité des isolats ; la diversité morpho-culturelle et génotypique à l'aide d'analyse de microsatellites (SSR), la détermination des deux mating types et la confirmation des résultats par la recherche et la caractérisation de la forme parfaite ; l'essai de différentes méthodes de lutte contre la septoriose : effet de la fertilisation azotée et potassique sur l'évolution de la maladie ainsi qu'une approche de lutte chimique et biologique contre l'agent pathogène.

Les prospections réalisées entre 2010 et 2013 sur l'ensemble des régions céréalières montrent une large distribution de la maladie de la tache septorienne, le taux de présence de la maladie, sur l'ensemble des champs prospectés, est estimé à 59%. La présence et la sévérité de la maladie dans les régions subhumides sont particulièrement importantes où la sévérité de la maladie selon l'échelle « double digit » atteint 98 et 99.

Les observations phénotypiques des colonies de *Z. tritici* sur milieu solide YMA, montrent une grande diversité de texture et de couleur. Les isolats de couleur rosâtre ont une texture crémeuse, présentent l'aspect le plus dominant. Les isolats de couleur sombre sont durs et compactes.

L'agressivité des isolats de la région Est sur une gamme variétale diversifiée de 16 variétés (blé dur, blé tendre et triticale) révèle que (04) isolats se distinguent par leur virulence en fonction du nombre maximum de feuilles infectées et du taux de recouvrement pycnidial. Les variétés les plus sensibles sont HD 1220 et Waha. Tandis que les plus résistantes sont Ain abid, Colosseo et Simeto. En effet, 10 isolats sur 26 montrent une spécificité physiologique pour le blé tendre ou le blé dur.

Neuf paires d'amorces microsatellite SSR (Simple Sequence Repeat) sont utilisées pour l'estimation de la variabilité génétique d'une population de *M. graminicola* constituée de 30 isolats issus de 27 champs de blé de l'Est algérien. Les résultats montrent l'existence d'un niveau très élevé de variabilité génétique de la population. 29 haplotypes différents sont obtenus.

Les résultats de la multiplex-PCR pour la détermination des deux idiomorphes (Mat1-1 et Mat1-2) montrent l'existence des deux idiomorphes en proportion relativement égale au sein de la population étudiée. Cela est confirmé par la mise en évidence de la forme parfaite dans cette étude et sa première signalisation au niveau de la wilaya de Constantine (El khroub) et en Algérie.

Les essais des méthodes de lutte révèlent des résultats intéressants pour l'établissement d'une stratégie de lutte intégrée.

Un apport foliaire d'engrais potassique au stade 1 à 2 nœuds, minimise les pertes de rendement de 14%, en évitant l'extension de la maladie sur la dernière feuille. L'efficacité des matières actives antifongiques testées est prouvée, néanmoins il existe des isolats plus sensibles que d'autres. Un grand potentiel d'inhibition des agents antagonistes testés sur la croissance de *Z. tritici* particulièrement, de l'isolat *Trichoderma asperelloides*.

Ce travail a permis la mise en évidence d'une importante diversité génétique des populations de *Z. tritici* algériennes. Une meilleure connaissance de l'agent pathogène, de la relation plante-pathogène et des différents moyens de lutte permettrait la mise en place d'une stratégie de lutte intégrée efficace contre la maladie de la tache septorienne du blé.

ABSTRACT

Mycosphaerella graminicola (anamorph *Zymoseptoria tritici*) the causative agent of septoria wheat disease can cause considerable loss of yields (35-60%), in particular in the Mediterranean regions. In North Africa, septoria leaf blotch (SLB) considered as the largest wheat disease. In Algeria, SLB is widely present in all northern regions.

The work objectives concern the evaluation of the phenotypic and genotypic diversity of *Z. tritici* pathogen in Algeria. Mainly, prevalence of the disease, aggressiveness of isolates, morpho-crop diversity, genotypic analysis using microsatellite (SSR), determination of both mating types and confirmation of the results by the search and the characterization of the perfect form. Also, testing different methods against SLB: effect of nitrogen and potassium fertilization on the evolution of disease and an approach of chemical and biological control against the pathogen.

Prospecting carried out between 2010 and 2013 on all grain-producing regions with a wide distribution of SLB disease. Attendance rate of disease across all surveyed areas estimated at 59%. The presence and severity of the disease in sub-humid regions are particularly important where the severity of the disease according to the "double digit" level reaches 98 and 99.

Phenotypic observations, of *Z. tritici* colonies on YMA solid medium, show a wide variety of texture and color. Pinkish color isolates have a creamy texture; they present the most dominant appearance. Dark isolates are hard and compact.

Aggressiveness of Eastern region isolates on varietal gamut of 16 varieties (durum wheat, bread wheat and triticale) shows that 04 isolates distinguished by their virulence based on the maximum infected leaves number and the pycnidial recovery rate. The most sensitive varieties are HD 1220 and Waha. While, most resistant are Ain Abid, Colosseo and Simeto. Indeed, 10 of 26 isolates showed a physiological specificity for durum wheat or bread wheat.

Nine microsatellite primer pairs SSR (Simple Sequence Repeat) used to estimate the genetic variability of *M. graminicola* population consisting of 30 isolates from 27 wheat fields of eastern Algeria. The results show a very high level of genetic variability in the population with 29 different haplotypes.

The results of multiplex-PCR for the determination of idiomorphic (Mat1-1 and Mat1-2) show the existence of two relatively even idiomorphic proportion in the studied population. This confirmed by the discovery of the perfect form of the pathogen, in this study, and its first signalization Constantine (El Khroub) and Algeria.

The test control methods reveal interesting results for the establishment of an integrated control strategy.

A foliar intake of potassium fertilizer at 1-2 knots stage minimizes 14% yield loss, avoiding the spread of the disease on the last sheet. The effectiveness of tested antifungal active compounds was proven, however there are more susceptible isolates than others. Great potential for *Z. tritici* growth inhibition by antagonists, particularly, with the isolate *Trichoderma asperelloides*.

This work allowed the identification of an important genetic diversity of Algerian *Z. tritici* populations. A better understanding of the pathogen, the plant-pathogen relationships and different control methods allow the establishment of an effective integrated control strategy against septoria wheat disease.

ملخص

إن عامل مرض *Mycosphaerella graminicola* (anamorphe *Zymoseptoria tritici*) من المسببات الرئيسية لظهور مرض تبقع الأوراق (tache septorienne) على القمح والتي تسبب في خسائر كبيرة في المحاصيل التي تصل إلى نسبة (35 إلى 60 %) خاصة في مناطق البحر الأبيض المتوسط. في شمال أفريقيا، يعتبر مرض تبقع أوراق من بين الأمراض الأكثر انتشارا عند القمح، في الجزائر يوجد على نطاق واسع في جميع المناطق الشمالية للبلاد.

هذا العمل يهدف إلى تقييم التنوع المظهري والوراثي للعامل المرضي *Z. tritici* في الجزائر. في الأساس تم الاعتماد على تقدير انتشار المرض، عدوانية العينات المعزولة، التغيرات المورفولوجية للمحاصيل والتحليل الوراثي باستخدام طريقة (SSR). تحديد نوعي التزاوج وتأكيد النتائج من خلال البحث عن الشكل المثالي وتوصيفه. اختبار أساليب مختلفة ضد تبقع الأوراق: تأثير التسميد النيتروجيني والبوتاسيومي على تطور المرض، واتباع نهج من المكافحة الكيميائية والبيولوجية ضد مسببات المرض.

أجريت عملية الاستطلاعات ما بين سنة 2010 و 2013 في جميع المناطق المنتجة للحبوب والتي وجد بها مرض بقع الأوراق، حيث قدر معدل وجود المرض في كافة الحقول التي تم مسحها بـ 59%. كما لوحظ أن المناطق الرطبة وجد بها المرض بشدة كبيرة حيث قدر في بعض الحالات بـ 98 و 99 على مستوى سلم « double digit ».

الملاحظات الشكلية للمستعمرات *Z. tritici* فوق وسط الزراعة الصلب YMA أظهرت مجموعة واسعة من البنى والألوان. المعزولات ذات اللون الوردي كان لديها قوام قشدي حيث تمثل المظهر الغالب. أما العزلات ذات اللون الداكن لها طبيعة صلبة و مترابطة.

النزعة العدوانية لعزلات المنطقة الشرقية على مجموعة مختلفة من 16 صنف (قمح لبين، قمح صلب و التريتيكالي) كشفت عن أن أربع عزلات تتميز بضرارة عالية و فقا للعدد الأوراق المصابة و معدل تغطية pycnidial. الأصناف الأكثر حساسية هم HD 1220 و واحدة. في حين الأصناف الأكثر مقاومة هم عين عبيد، كولوسو و سيميتو. في حين ، 10 عزلات من بين 26 عزلة أظهرت خصوصية فيزيولوجية للقمح الصلب أو الطري.

استخدمت تسعة أزواج من الشعائل SSR (Simple Sequence Repeat) لتقدير التغير الجيني لمجموعة *M. graminicola* تتكون من 30 عزلات حصل عليها من 27 حقل القمح في شرق الجزائر. أظهرت النتائج وجود مستوى عال جدا من التنوع الوراثي و تم الحصول على 29 نسخة متنوعة.

نتائج ال PCR لتحديد نوعي التزاوج (Mat1-1 و Mat1-2) تبين وجودهما بمعدلات متساوية نسبيا. وهذا ما تم تأكيده باكتشاف الشكل المثالي في هذه الدراسة، وإشارات الأولى في ولاية قسنطينة (الخروب) والجزائر.

اختبارات طرق المكافحة ضد مرض تبقع أوراق القمح تكشف عن نتائج مثيرة للاهتمام لوضع استراتيجية المكافحة المتكاملة.

استعمال أسمدة البوتاس على مستوى الأوراق في مرحلة 1-2 عقدة يقلل بـ 14% خسائر المحصول وتجنب انتشار المرض على الورقة الأخيرة. قد ثبت الاختبارات فعالية المكونات النشطة المضادة للفطريات، ولكن هناك عزلات أكثر حساسية من غيرهم. إمكانات كبيرة لتثبيط نمو *Z. tritici* باستعمال عوامل الخصوم الحيوية، بشكل خاص، عزل *Trichoderma asperelloides*.

سمح هذا العمل بتحديد تنوع وراثي مهم لـ *Z. tritici* الجزائري. فهم أفضل لمسببات المرض، العلاقات قمح - مرض وطرق التحكم المختلفة تسمح بوضع استراتيجية المكافحة المتكاملة ضد مرض تبقع أوراق القمح.