

*Thèmes Recherche de marqueurs
biologiques et moléculaires (RAPD) pour
l'étude de la diversité génétique d'
Uromyces viciae-fabae, agent de la rouille
de la fève/ féverole.*

Présenté par:

Mr AZIRI Hocine

Mr BOUZNAD Z. Professeur INA D. de thèse

Date de soutenance: 08/02/2007

Jury Mme LOUANCHI M. Maître de conférence INA. Président Mr KEDDAD A. Chargé de cours INA.
Examineurs Mr GHEZLANE A. Maître de conférence INA. Examineurs Mr KHELIFI L. Maître de
conférence INA. Examineurs

Table des matières

Résume .	1
Summary . .	3
ص . .	5
Introduction . .	7
Chapitre I : Données bibliographiques . .	11
I.1- Données générales sur <i>Uromyces viciae-fabae</i> , agent de la rouille de la fève/ fèvevole .	11
I.1.1- Symptomatologie .	11
I.1.2- Cycle biologique . .	12
I.1.3- Facteurs écologiques liés à la germination des urédospores de rouilles .	14
I.1.4 - Variabilité du pouvoir pathogène et spécialisation parasitaire . .	16
I.2. Caractérisation génétique des populations de pathogènes . .	18
I.2.1- Marqueurs génétiques utilisés dans la caractérisation de la diversité génétique des populations de pathogènes . .	18
I.3 - Les marqueurs moléculaires utilisés en génétique des populations de pathogènes .	20
I.3.1- Les marqueurs RAPD . .	20
I.3.2- Les microsatellites ou marqueurs SSR .	21
I.3.3- Les marqueurs AFLPs .	21
Chapitre II. Matériel et méthodes .	23
II.1- Matériel végétal .	23
II.1.1- Obtention des plants . .	23
II.2- Matériel fongique . .	24
II.2.1- Collecte des échantillons .	24
II.2.2- Purification des isolats à partir d'une seule pustule .	24
II.2.3- Multiplication des pustules purifiées .	25
II.3- Etude du polymorphisme par les marqueurs morphologiques .	26

II.3.1- Mesuration des urédospores . .	26
II.3.2- Etude du pouvoir germinatif et infectieux des urédospores d ' <i>U. viciae fabae</i> .	27
II.4- Technique d'étude du polymorphisme génétique par les marqueurs RAPD. .	28
II.4.1- Obtention de L'ADN .	29
II.4.2- Mise au point des paramètres de la RAPD .	30
II.5 - Analyse de la variabilité du pouvoir pathogène .	32
II.5.1- Dispositif expérimental . .	32
II.5.2 – Inoculation .	32
II.5.3 – Notation et expression des symptômes .	33
II.5.4- Analyse statistique et construction des dendrogrammes .	33
Chapitre III. Résultats et discussion . .	37
III.1- Mise en évidence d'un polymorphisme par les marqueurs morphologiques (mesuration) et par l'étude de la durée de la viabilité et pouvoir infectieux des urédospores .	37
III.1.1- Mesuration des urédospores .	37
III.1.2- Etude de la durée de viabilité et du pouvoir infectieux des urédospores d' <i>U. viciae-fabae</i> .	40
III.2 – Variabilité du pouvoir pathogène .	48
III.2.1- Présentation des résultats . .	48
III.2.2- Discussion .	51
III.3 - Etude du polymorphisme par les marqueurs moléculaires . .	54
III.3.1- Optimisations des extractions .	54
III.3.2- Etude du polymorphisme génétique par RAPD . .	57
Conclusion .	67
Références bibliographiques .	71
Annexes . .	79
Annexe 1 . .	79
Annexe 2 . .	84
Annexe 3 . .	92

Résumé

Cette étude a porté sur l'analyse de la diversité génétique d'*U viciae-fabae*, agent causal de la rouille des fèves, par l'analyse de la diversité à trois niveaux. Au niveau morphologique et culturale, par la mensuration des urédospores et ensuite par l'étude du pouvoir germinatif et du pouvoir infectieux de ces urédospores, au niveau du pouvoir pathogène et enfin, au niveau moléculaire, par l'analyse génétique, utilisant les marqueurs RAPD.

Les marqueurs morphologiques et culturaux n'ont révélé aucune différence significative entre les 11 isolats étudiés. Le test du pouvoir germinatif et du pouvoir infection a, par la même occasion, montré que la durée de viabilité et du pouvoir infectieux des urédospores serait de 4 mois à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 mois à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ et de quelques jours à la température ambiante. Le test du pouvoir pathogène a montré une différence entre les 11 isolats et que ces isolats pourraient être classés en deux groupes constituant chacun une race physiologique. Les marqueurs RAPD ont permis de confirmer la diversité révélée par le test du pouvoir pathogène. Ces deux tests ont également permis de faire un tri des isolats en fonction de leur origine géographique. Cependant, la tentative de corrélation entre ces deux tests a montré un faible niveau de corrélation.

Summary

This research was based on the study of the genetic diversity of *U. viciae fabae*, pathogen of faba bean, causing rust disease. The approach was based on the analysis of the morphological and cultural, pathogenicity and molecular markers using RAPD's markers.

At the morphological and cultural level, there was no significant difference between the 11 isolats tested. The germ test applied to the 11 isolats, revealed that isolats loose their infection capability after 4 months at the conservation temperature of -20 °C, after 2 months at 4°C, After some days at Ambient temperature. The pathogenecity test reveals a significat difference between the 11 isolats tested, which can be divided into two physiological races of this pathogen. The RAPD's markers gave us a confirmation on the genetic diversity revealed by the pathogenecity test. The two tests allowed us to make a geographical selection between isolats. Although, the trial correlation test carried out between the pathogenicity and the molecular markers, revealed a low correlation level.

Introduction

Problématique

La fève est une légumineuse largement cultivée dans le bassin méditerranéen. En Algérie, elle occupe 0.43% de la SAU et 48 % de la superficie consacrée aux légumineuses alimentaires, ce qui fait d'elle la légumineuse à grosses graines la plus cultivée (Maatoughi, 1996).

Toutefois, cette culture a connu une baisse considérable dans les rendements au cours des années 2000 à 2002 (Feliachi, 2002), bien que les conditions climatiques enregistrées étaient très favorables. En effet, durant cette période, la pluviométrie et l'humidité, ont atteint des chiffres record et ont permis de ce fait, un développement accru de certaines maladies à caractère épidémique, à l'instar de la rouille de la fève causée essentiellement par *Uromyces viciae-fabae* (Pers) Shroet 1875. Vers les années 1995 à 1998, Cette maladie avait déjà commencé à prendre de l'ampleur de par la fréquence et l'intensité des attaques enregistrées (Bouznad et *al.*, 1996 ; Ait issad et Aziri, 1999).

Cette rouille, inféodée à la fève et, à la fèverole ainsi qu'à d'autres légumineuses alimentaires et fourragères, cause des dégâts considérables pouvant aller jusqu'à la perte totale de la récolte. C'est ainsi qu'en cas d'attaques sévères, les feuilles se dessèchent rapidement, ce qui peut occasionner vers la fin de la saison, une défoliation prématurée. Lorsque la sévérité de la maladie atteint un degré élevé, on assiste à un avortement des fleurs et /ou à une contamination des gousses. Ce qui rend cette maladie transmissible par la semence (Mac Leod 1996). La semence ainsi contaminée ces urédospores de fin de saison, sera à l'origine des infections primaires et qui entraîneront en conditions

optimales d'infection, des situations épidémiques souvent incontrôlables.

La phase épidémique d'*U. viciae-fabae* est constituée par la répétition de plusieurs cycles à urédospores, pouvant aller jusqu'à dix par saison culturale (Sache, 1995). Le potentiel épidémique de ce champignon est dû essentiellement à sa capacité de dissémination très étendue par ses urédospores. Comparable à ce qui a été rapporté sur les céréales par Rapilly, (1991), cette capacité de dissémination serait, pour *U. viciae-fabae*, à l'origine de transfert de gènes de virulence d'un pays à l'autre ; c'est ce qu'on appelle le flux de gènes (gene flow). La forte capacité de sporulation d'*U. viciae-fabae*, permettant une compensation des grandes pertes en unités de dissémination, est la cause de graves épidémies de rouille sur fève et autres légumineuses hôtes (Clement et al., 1998)

La rouille de la fève/ féverole, comme toutes les rouilles qui se développent sur les plantes, est donc une maladie épidémique et probablement très diversifiée au niveau intra-spécifique. En effet, des études menées sur cet agent pathogène ont mis en évidence l'existence probable d'une variabilité génétique en races et formes spéciales de ce champignon (Conner et Bernier, 1981 ; Meskine, 1996 ; Ait issad et Aziri, 1999 ; Emeran et al., 2001). Un certain niveau de variabilité quantitatif du pouvoir pathogène, régi par une interaction polygénique, et dont la résistance est incomplète ou partielle, a été également rapportée. Par ailleurs, il a été observé que cette résistance incomplète ou partielle s'exprimerait de deux manières dont l'une agissant sur la sévérité de la maladie sans générer de réaction nécrotique et l'autre faisant intervenir la réaction d'hypersensibilité (Sillero et al., 2001).

Tous ces comportements biologiques laissent supposer l'existence d'une diversité génétique chez ce champignon appartenant aux *Pucciniaceae*, et dont presque la totalité des espèces, à l'instar des espèces du genre *Puccinia*, ont été rapportées génétiquement très diversifiées (Kolmer, 1997)

Il est connu qu'une diversité au sein des populations, entre les espèces et les écosystèmes, accroît la possibilité de survie de ces espèces dans leurs écosystèmes. C'est ainsi que l'acquisition ou la perte d'une diversité dans une population entraînerait des effets sur les autres populations.

Parmi les modèles les plus étudiés pour la compréhension de cette dynamique des populations, figure le modèle population végétale / population pathogène (Kolmer, 1997). Dans celui-ci, les concepts de : virulence et/ou agressivité / sensibilité, avirulence / résistance ou tolérance, ainsi que les concepts de : sélection, mutation et recombinaison, contribuent largement aux mécanismes de survie dans ces écosystèmes très complexes qui restent néanmoins à illucider

Objectifs de l'étude

Toutes ces caractéristiques liées à la biologie de ce champignon, ont inspiré la présente approche pour l'initiation d'une étude portant sur la diversité génétique de cet organisme fongique. Ces travaux sont réalisés dans une optique fondamentale, pour la compréhension des relations hôtes – pathogènes biotrophes et dans un but appliqué, pour une perspective de lutte basée sur la connaissance de cette diversité. C'est ainsi que

ce travail s'inscrit parmi les nombreuses tentatives d'investigations ayant trait à l'étude de la génétique des populations pathogènes, en s'intéressant de très près à la diversité génétique d' *U. viciae-fabae*. Pour ce faire, les présents travaux ont été menés pour les objectifs suivants :

L'étude de la diversité par les marqueurs morphologiques et culturels nous permettra d'identifier d'éventuels critères morphologiques, séparant les individus étudiés. Cette approche est envisagée par des mensurations effectuées sur des urédospores, d'une part, et par l'étude de la durée du pouvoir germinatif ainsi que du pouvoir infectieux des isolats de ce champignon, d'autre part. L'étude de la durée du pouvoir germinatif ainsi que du pouvoir infectieux nous permettra de connaître effectivement la durée de vie des urédospores, pour pouvoir reconstituer, lorsque c'est nécessaire, les isolats utilisés tout le long des manipulations. Une autre approche consiste à étudier cette diversité par les marqueurs moléculaires, notamment par des marqueurs RAPD. Celle-ci nous permettra de confirmer l'existence d'une diversité génétique chez ce champignon. Cependant, avant la réalisation de cette étape, il était nécessaire d'optimiser un protocole efficient d'extraction d'ADN, en expérimentant trois protocoles basés respectivement sur l'utilisation de l' SDS, du CTAB et du complexe SDS/CTAB

L'étude de la variabilité du pouvoir pathogène nous permettra d'apprécier l'existence probable de race physiologique de ce pathogène, dont l'identification avait déjà fait l'objet de travaux antérieurs dans le pourtour méditerranéen (Emeran et al ., 2001). Aucun des cultivars utilisés dans ce test ne figure parmi la gamme différentielle habituelle de ce pathogène

Tenter d'établir une relation entre les marqueurs de pathogénicité et les marqueurs RAPD en essayant de corréliser ces deux marqueurs

Chapitre I : Données bibliographiques

I.1- Données générales sur *Uromyces viciae-fabae*, agent de la rouille de la fève/ fèverole

Uromyces viciae- fabae est un champignon appartenant aux basidiomycota, à la classe des Uredinomyces. C'est l'agent causal d'une rouille de macrocyclique et autoxène), essentiellement inféodée aux légumineuses alimentaires notamment, la fève par excellence, le pois et la vesce. Néanmoins le cycle biologique n'est souvent pas complet en toutes régions et sur l'ensemble des plantes. Il peut ainsi y avoir des stades manquants, comme c'est le cas dans les régions équatoriales, où le champignon ne forme que des urédospores (Hariat,1908 ; Guyot,1957).

I.1.1- Symptomatologie

Cette maladie se manifeste sur la fève, par l'apparition de pustules de couleur roux qui correspondent généralement aux urédosores printanières. Ce stade est toujours précédé par le symptôme d'ébauches pustuleuses observées surtout en conditions contrôlées. Ce dernier est difficilement décelable au champ, étant donné qu'il passe souvent inaperçu, ou qu'il peut être confondu avec d'autres symptômes causés notamment par les insectes (

Ait issad et Aziri, 1999) (Fig. 1). Les urédospores ainsi formées dans les urédosores, constituent le point de départ d'une épidémie lorsque les conditions s'y prêtent (Saché, 1995 et 1994). Vers la fin du printemps, ceux-ci se transforment en téliosores contenant des teliospores, organes de conservation de l'inoculum dans le sol en absence de la culture.

I.1.2- Cycle biologique

Le champignon peut être décrit selon deux systèmes, à savoir le système morphologique « morphologic basis system » et le système cytologique « cytologic basis system » (Laundon,1973). Il existe généralement chez les rouilles cinq stades morphologiques bien distincts (Tabl. 1), à l'exception des cas de cycle se déroulant dans les pays chauds où le stade télie est absent (Laundon,1973 ; Guyot., 1957 et Hariot,1908).



Fig. 1 : Symptôme représentant les ébauches pustulaires

Symbole		Nom retenu		Synonymie	
Français	Anglais	Sores	Spores	Français	Anglais
S	O	Pycnies	Pycniospores	Spermogonies, Spermaties	Spermogonia, Spermatia
I	I	Écidies	Écidiospores	Écidies, Écidiospores	Aecia, aecidia, Aeciospores
II	II	Urédie	Urédospores	Urédies, Urédospores	Uredia, Uredinia, Urediniospores
III	III	Télie	Téliospores	Teuletosores, teuletospores	Telia, Teliospores
O	IV	Baside	Basidiospores	-	Basidia

Tableau 1 : Nomenclature et dénomination des stades de rouilles.

Source : Keddad, 1997

I.1.2.1- Description morphologique

Celle-ci permet la description des cinq stades de la rouille, selon la morphologie des spores et des sores de chaque stade.

- **Le stade spermogonie** : Est représenté par l'apparition des spermogonies ou pycnies ; ces organes contiennent des hyphes flexueux et des periphyses, à l'intérieur desquelles sont produites des spermaties (pycniospores). Ces dernières naissent sur des pycniosporophores en succession basipète (Littelfield et Heath, 1979).
- **Le stade écidie** : il est défini par la formation des écidies ou écidiosores qui prennent naissance sur la face inférieure des feuilles et dont les pustules contiennent les écidiospores, produites en chaîne (Littelfield et Heath, 1979). Selon l'absence ou la présence ou bien la forme du peridium, les rouilles sont classées dans une hiérarchisation écidienne qui les subdivise en cinq types morphologiques (Littelfield et Heath, 1979, et Guyot, 1957), ou en quatre types (Laundon, 1973, et Cummins, 1959). Ainsi, le type « Aecidoid Aecium » renferme les *Pucciniaceae* comprenant les espèces du genre *Uromyces sp.*
- **Le stade urédie** : Il correspond aux pustules ou urédosores qui produisent des urédospores. Ce stade s'effectue d'une manière répétitive (Hiratsuka, 1973). Les

urédosores sont de couleur brun cannelle. Elles sont soit éparses, ou réunies en cercles concentriques (Guyot, 1957). Le péridium est typiquement absent (Cummins, 1959).

- **Le stade télie** : Il apparaît sous forme de pustules encore appelées télisosores, contenant des probasides (téliospores), lesquelles donnent naissance à des promyceliums, qui sont assimilables à des basides, puis des basidiospores (Hiratsuka, 1973). Ces organes sont l'aboutissement final de l'évolution des urédosores, par coloration noirâtre de ces urédosores ; ils naissent donc sur la même structure sporifère tout en augmentant de taille (Guyot, 1957).
- **Le stade baside** : Il correspond à la formation des basides lorsque les conditions sont favorables. Ainsi la germination des télispores intervient au bout de quelques jours et chacune donne une baside à quatre basidiospores (Cummins, 1959 ; Guyot, 1957 Littlefield et Heath, 1979).

I.1.2.2- Description cytologique

Les événements cytologiques qui se succèdent le long de ce cycle sont la formation des basidiospores à partir de basides après une caryogamie suivie par une méiose. Cette division réductionnelle du noyau donne naissance à quatre noyaux haploïdes (Ainsworth, 1971 et Martin, 1957, in Littlefield et al., 1979). Chacun des noyaux haploïdes migre dans un stérigmate donnant ainsi quatre basidiospores hétérothaliques qui portent deux à deux des signes différents (Semal, 1989). La formation des écidiospores intervient après une dicaryotisation, suite à la fusion d'une spermatie et un hyphe réceptif (hyphe flexueux), issus de deux sores ou pustules de signes différents (hétérothallisme) (Hiratsuka, 1973). La spermatisation est ainsi effectuée, le dicaryon entame une migration le long de l'hyphe réceptif. Ce dernier renfermera alors des dicaryons transitoires. Un dicaryon stable apparaît une fois le « protoecium » est atteint. Ce phénomène est rapidement suivi par une division nucléaire conjuguée, dont les noyaux qui en résultent vont migrer vers d'autres cellules du protoecium, donnant à leur tour des cellules dicaryotiques, puis des écidies (Allen, 1930 ; Graigie, 1927 ; Pierson, 1933 in Littlefield et Heath, 1979).

Les urédospores qui renferment toujours le dicaryon, sont produites à partir d'un mycélium dicaryotique, lui-même issu de la germination d'une écidiospore dicaryotique (Hiratsuka, 1973).

Après plusieurs cycles répétitifs d'urédospores, apparaissent les télispores sur les précédentes structures (urédosores), lesquelles donnent naissance à des basides. Celles-ci produisent à leur tour des spores sexuées appelées basidiospores (Hiratsuka, 1973).

I.1.3- Facteurs écologiques liés à la germination des urédospores de

rouilles

La germination des urédospores d' *Uromyces viciae-fabae* est tributaire des conditions de l'environnement (extrinsèques) et de facteurs endogènes (intrinsèques).

I.1.3.1- Conditions extrinsèques

Les conditions optimales de germination des urédospores varient selon les auteurs. Ainsi pour Guyot (1957), les urédospores germent au minimum à 1 – 2°C et au mieux à 16 – 20°C, avec un optimum à 18°C et une limite maximale à 31 °C. Joseph et Hering (1997), considère que les urédospores germent mieux dans une fourchette de 5 – 26°C, avec un optimum à 20°C, alors qu'une exposition des spores à une température de 30°C donnerait peu ou pas de germination, et engendrerait une altération de la majorité des urédospores. Il considère également qu'une durée d'humectation des feuilles de quatre heures suffirait pour avoir une infection. Lorsque cette durée excède les 24 heures, le taux d'infection par le champignon augmente sensiblement. Clement (1993, a) rejoint Joseph (1997) pour ce qui est de l'optimum thermique, mais considère par ailleurs, que l'optimum en humidité relative varie entre 85 et 95%. Pruter et al., (1991), rapportent que l'optimum thermique se situe entre 20 et 25°C, tandis que Meskine (1996), évoque un optimum thermique entre l'intervalle 16 - 20°C et un optimum hygrométrique ; proche de 100% Hr. Selon Hiratsuka (1936) in Guyot (1957), l'optimum se situe entre 16 et 22,5°C. par rapport aux basses températures, le mycélium urédosporifère résiste au froid et survit dans les feuilles et les tiges de la plante en hiver, d'où la possibilité de contamination précoce durant la saison (Sache, 1995)

Le comportement du champignon vis-à-vis de la photopériode a également été sujet à des données controversées. En effet Joseph, (1997) a rapporté qu'une germination des spores serait favorisée par la lumière du jour ou tout autre source de lumière contenant des infrarouges lointains, de longueur d'onde se situant entre 700 et 800 nm ; une alternance de périodes sombres et illuminée d'environ 40 minutes d'obscurité, suffirait largement à induire une bonne germination des urédospores à 20°C. Par contre Foster et al., (1993), estiment que la photopériode propice à la germination, se situe entre 16 et 18 heures de lumière naturelle.

L'influence de l'état hygrométrique sur la germination et sur le pouvoir infectieux du champignon, a été étudiée par Garofalo (1948) in Guyot (1957). Ce dernier a constaté que la germination des urédospores entre 20 et 25°C est rapide et totale à 100% d'humidité relative, plus lente et partielle (70% de germination) à 95% d'humidité relative, et nulle ou rare à 80% d'humidité relative. De telles données voudraient dire que des humidifications fréquentes des feuilles inoculées artificiellement est nécessaire pour produire une germination des urédospores et une infection des plantes inoculées. Une hygrométrie apportée à une telle fréquence est par ailleurs néfaste lorsqu'elle est appliquée par pulvérisation ; étant donné qu'elle engendre un ruissellement accru des urédospores, empêchant de ce fait la généralisation des symptômes à toute la plante. Pour éviter cette situation Il est conseillé d'utiliser un humidificateur, ou encore, de procéder à une humidification par capillarité (Ait Isaad et Aziri, 1999).

I.1.3.2-Conditions intrinsèques

Les spores sèches de champignons biotrophes sont connues pour avoir un potentiel énergétique très bas, ne leur permettant pas d'initier l'activation du métabolisme de germination en condition de basses températures. Les toutes premières phases d'activation de ce métabolisme sont détectées suite à une hydratation des spores. C'est ainsi qu'une imbibition à 0°C a pu mettre en évidence un changement dans le pool énergétique représenté par le ratio nucléosides / nucléotides avant et après germination (Wagner et al.,1994). Ainsi donc, le succès de l'infection par les urédospores des rouilles, dépend d'une efficacité de la germination elle-même tributaire de l'activation du métabolisme, dépendant par la même, des accumulats emmagasinés au cours de la sporogénèse (Wagner et al.,1993).

Le potentiel métabolique réduit, caractérisant les spores de rouilles, est dû aux conditions de déshydratation que subissent ces spores (Sussam et Douthite,1973 in Wagner et al.,1993) ainsi qu'aux substances inhibitrices de la germination, élaborées au cours du processus d'évolution des urédospores (Staples et Macko,1984 ;Wolf,1982 in Wagner et al.,1993).

La germination de ces spores est aussi inhibée par ces auto inhibiteurs, lorsque celles-ci flottent en population dense dans un milieu aqueux (Allen et al.,1971). Ces auto-inhibiteurs sont pour la plupart des dérivés d'acide cinammomique, à savoir, le 4-Hydroxy-3-methoxy cinnamate et le methyl 3-4-di methoxy cinnamate (Macko et al., 1972, 1970). Il semblerait qu'il y ait une interaction entre ces substances et les enzymes responsables de la digestion des pores germinatifs, en inhibant l'action de ces enzymes (Samuel et al.,1975).

I.1.4 - Variabilité du pouvoir pathogène et spécialisation parasitaire

Les agents de rouille ont souvent développé une étroite spécificité parasitaire, alors que, certains d'entre eux possèdent une large gamme de plantes hôtes (Arthur,1934). *Uromyces viciae-fabae* est un champignon parmi ceux qui ont été reconnus très polyphages, puisqu'il passe sur de nombreuses légumineuses alimentaires comme la fève et le pois et la lentille (Meskine, 1996). Il s'attaque également à d'autres légumineuses fourragères et ornementales comme la vesce ; *Vicia sativa* (Hariot,1908 ; Guyot,1957 ; Conner et Bernier, 1982a ; Meskine,1996 ; Ait issad et Aziri,1999) et d'autres espèces appartenant notamment aux genres *Vicia*, *Lathyrus* et *Pisum* (Meskine,1996 ; Conner et Bernier,1982a ; guyot,1957 ; Hariot,1908) et au genre *Tetragolobus* (Guyot,1957).

Indépendamment de cette variabilité interspécifique (polyphagie), le champignon a développé une certaine variabilité intra-spécifique, notamment pour ce qui est de la spécialisation parasitaire. L'existence de cette variabilité a été confirmée par certains auteurs et non admise par d'autres. En effet, d'après la revue bibliographique élaborée par Guyot (1957), même les auteurs approuvant la notion de forme spéciale divergent dans leurs opinions. Ainsi Jordi (1904) ne reconnaît que la forme spéciale d'*U. viciae-*

fabae sur *Vicia faba* et *Pisum sativum* ainsi que la forme spéciale *orobi* sur *Lathyrus montanus*. La forme spéciale *viciae-fabae* ne passe jamais sur les autres espèces du genre *Vicia*, *Lathyrus* et *Tetragonolobus*. La forme spéciale *orobi* ne passe pas sur les autres espèces du genre *Lathyrus* et les espèces du genre *Vicia* ainsi que sur le pois. Hiratsuka et al., (1933), ont pour leur part reconnu à la forme spéciale *Viciae-fabae* deux hôtes possibles à savoir la fève et le pois. Il évoque par ailleurs, l'existence de deux autres formes spéciales inféodées au pois (*f.sp pisi*) et au genre *Lathyrus* (*f.sp lathyri*). D'autre part Ficher (1902), a signalé une forme spéciale étroitement inféodée à *V. cracca*, alors que Jordi (1904) aurait obtenu avec cette forme une infection normale sur le pois.

Jordi cité par Hariot, (1908), distingue quant à lui trois formes spéciales sur *L. vernus*, *P. sativum* (pois), et *Vicia cracca*.

Chung et al (2004), ont rapporté que des travaux menés au Japon, ont révélé qu'*U. viciae-fabae* a également fait l'objet d'une classification en variété de l'espèce, basée notamment sur la spécialisation sur différents hôtes et sur une variabilité au niveau de l'épaisseur des parois des urédospores.

Par ailleurs, d'autres auteurs confirment l'existence d'une variabilité pour la spécialisation parasitaire, mais qui n'est pas suffisamment claire pour affirmer l'existence de forme spéciale de ce champignon (Ait issad et Aziri, 1999 ; Meskine, 1996 et Conner et Bernier, 1981). En effet, pour ces derniers, les différents isolats d'*U. viciae-fabae* partagent plusieurs hôtes en commun ; le concept de forme spéciale paraît donc à ces auteurs inapplicables. Egalement, l'analyse au Japon de différents composés de parois d'urédospores et de téliosporos appartenant à 94 isolats et issus des genres *Vicia*, *Lathyrus* et *Pisum*, n'a décelé aucune différence significative entre eux, d'une part. D'autre part, l'approche moléculaire basée sur l'analyse des régions D1/D2 et ITS, a montré que 23 des isolats issus de *Vicia*, *Lathyrus* et *Pisum* sont réunies dans un même groupe génétique. Cette même étude a aussi révélé que 4 isolats provenant de *V. cracca*, et de *V. unijuga* pouvaient infecter et sporuler sur *P. sativum*. Ces résultats suggèrent donc que les populations d'*U. viciae-fabae* qui s'attaquent à différentes espèces ne sont pas aptes à être classifiées en variétés (Chung et al 2004).

Une autre forme de variabilité intra-spécifique liée à la spécialisation physiologique a été décrite. Meskine, (1996), Conner et Bernier, (1982a) ont rapporté que la variabilité génétique de ce champignon serait liée à cette spécialisation physiologique due à une existence de races physiologiques. En effet, Kispatic (1944), cité par Guyot (1957), après avoir testé le comportement de 14 variétés de fève, à l'égard de 16 isolats d'*U. viciae-fabae* provenant de 3 localités allemandes, a reconnu l'existence de races biologiques. Dans un travail antérieur, Ait Issad et Aziri (1999), ont suggéré la possibilité d'existence de races physiologiques du champignon dans les conditions algériennes, suite au test du pouvoir pathogène réalisé sur 3 isolats d'*U. viciae-fabae* vis-à-vis de 6 cultivars de fève/fèverole. Emeran et al., (2001), ont étudié le comportement de 23 isolats d'*U. viciae-fabae* provenant du pourtour méditerranéen, de Hollande, du Chili et d'Australie vis-à-vis d'une gamme différentielle composée de 7 lignées, et ont identifié à cet effet 16 races physiologiques.

I.2. Caractérisation génétique des populations de pathogènes

La diversité génétique des populations pathogènes peut être affectée dans sa dynamique par des événements tels que le flux de gènes (la migration), la pression de l'inoculum, la sélection raciale ainsi que les recombinaisons et mutations.

Le flux de gène est à l'origine de l'incorporation de gènes nouveaux dans les populations pathogènes à dispersion éolienne, comme c'est le cas chez les rouilles (Rapilly, 1991).

L'effet de la pression de l'inoculum est étroitement lié à la composition génétique de la population hôte. En effet, dans une population d'hôtes diversifiés, comme dans le cas des mélanges de variétés, utilisées pour lutter contre les rouilles des céréales, ou tout autre uridinée, il peut y avoir une dynamique régressive due à des effets purement physiques tels que le phénomène de dilution de l'inoculum et / ou le phénomène de barrière. Ce dernier est dû aux plants résistants qui interrompent le mouvement des spores d'un plant sensible à l'autre (Chin et Wolf, 1985).

Au Canada, c'est la sélection des races qui a permis un changement dans la structure raciale de la population de rouille noire. Ce changement s'est fait dans le temps, en réponse à la succession d'année en année de variétés de blés sur les mêmes parcelles céréalières (Kolmer, 1997).

C'est principalement la reproduction sexuée qui est à l'origine de la diversité génétique intra-spécifique, par le biais des recombinaisons génétiques par incorporation des gènes nouveaux dans les génotypes recombinants (Brown et *al.*, 1997). Ainsi le manque de diversité dans les populations de rouille se développant dans la tundra, serait dû à l'absence du stade spermogonie (Saville, 1985). La présence ou l'absence de la reproduction sexée influencerait donc, considérablement la diversité raciale des rouilles (Kolmer, 1997). Les allèles de virulence peuvent également s'acquérir par les mutations qui s'expriment généralement par la perte de la fonction avirulence en faveur de la fonction virulence (Bandel et *al.*, 1997)

I.2.1- Marqueurs génétiques utilisés dans la caractérisation de la diversité génétique des populations de pathogènes

Afin de caractériser et d'analyser la diversité des populations pathogènes, une gamme de marqueurs génétique a été développée au cours dutemps (Newton, 1987).

I.2.2.1 - Marqueurs morphologiques

Les critères morphologiques et culturaux ont souvent servi comme marqueurs de diversité

pour les pathogènes nécrotrophes qui se développent facilement sur milieu axénique. Pour ceux là, des variations au sein des colonies telles que la couleur et/ou le taux de croissance ont été utilisées. La mensuration des spores sexuées ou asexuées a également été étudiée en tant que marqueur morpho-cultural (Burdon,1993). Quant aux pathogènes biotrophes dont la multiplication se fait nécessairement sur la plante hôte d'origine, ils n'exhibent nullement ou rarement de variabilité à l'échelle micro ou macroscopique, bien qu'ils soient génétiquement très diversifiés.

Ainsi, aucune variabilité morphologique en relation avec la mensuration des longueur et largeur des urédospores n'a été décelée chez *Uromyces viciae-fabae* (Ait Issad et Aziri, 1999). Cependant, une variabilité ultrastructurale pourrait exister chez ce champignon, comme c'est le cas de *Puccinia menthae*, pour lequel une légère variabilité ultra-structurale a été mise en évidence (Edwards et al .,1999). Ce type de marqueur parrait donc peu ou pas adapté aux biotrophes.

I.2.2.2 - Marqueurs génétiques de virulence et/ou d'agressivité

Très souvent, il est fait recours à ce genre de marqueurs lorsqu'il s'agit de caractériser des populations biotrophes, dont l'interaction hôte –pathogène pour la virulence est du type gène pour gène (Flor, 1955 et 1956 Vander Plank 1968, 1978 et 1982 ; Day 1987 ; Burdon, 1997). Ces marqueurs permettent d'étudier la variabilité du pouvoir pathogène et par la même d'identifier les races physiologiques lorsque la gamme différentielle est disponible (Vander Plank, 1968). Ainsi, pour *U. viciae-faba,e* il a été reconnu l'existence de races physiologiques (Guyot.,1957 ; Conner et Bernier,1982b ; Meskine., 1996 ; Ait issad et Aziri,1999) ; un certain nombre d'entre elles ont été identifié (Emeran et al .,2001).

I.2.2.3 - Marqueurs biochimiques (iso-enzymes et les allo-enzymes)

Les marqueurs biochimiques tels que les iso-enzymes et les allo-enzymes sont plus spécifiques, comparés aux marqueurs de virulence (pathogenicité), puisqu' ils permettent d'une part, d' étudier le produit direct des gènes (Lu et al .,1987), et d'autre part, ils génèrent des marqueurs co-dominants (Burdon, 1993). Cette particularité leur a valu une réputation de bons marqueurs de diversité génétique (Burdon et Roelfs,1985).

Les pathogènes biotrophes hautement spécialisés tels les agents de rouilles, de mildious et d'oïdia, ne montrent fréquemment pas ou peu de variabilité concernant l'étude des iso –enzyme ou allo-enzymes. Ainsi un certain niveau de variabilité a été détecté chez *U. appendiculatus* (Lu et Groth,1987). Ce n'est toutefois pas le cas de *P. striiformis* (Newton et al., 1985) et d' *U. vicae- fabae* (Stoddard et al., 1998), auxquels ces marqueurs s'avèrent inadaptés.

I.2.2.4 - Marqueurs moléculaires

Ces marqueurs sont très utilisés dans la caractérisation génétique des populations pathogènes (Burdon,1993), ainsi que dans les études qui ont trait à la taxonomie des

champignons (Merzenberg, 1991).

L'utilisation de tels marqueurs dépend du but recherché par l'expérimentation. En effet, les marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) donnent des résultats satisfaisants lorsqu'ils sont appliqués à l'étude de la diversité génétique. Les marqueurs SSR (Simple Sequence Repeat) sont beaucoup plus intéressants pour l'élaboration des cartographies génétiques. Par ailleurs, leur utilisation dépend de la biologie du pathogène impliqué. Ainsi les agents nécrotrophes multipliés sur milieu artificiel générant en quantité suffisante un matériel biologique sain ou très peu contaminé, peuvent par exemple, être analysés par une RFLP. Celle ci est réputée pour ses marqueurs co-dominants, toutefois elle nécessite une importante concentration en ADN à analyser (50-100 ng / μ l). Par contre, pour les agents biotrophes dont la culture artificielle est souvent impossible et qui nécessitent de ce fait une multiplication sur plantes hôtes naturelles, il est toujours fait recours aux techniques de marquage moléculaire basées, sur l'amplification par PCR, comme la RAPD ; cette technique exige beaucoup moins d'ADN . Une quantité de l'ordre de 5 à 10 ng / μ l est suffisante pour effectuer une analyse génétique (Mac Donald, 1997 ; Burdon, 1993).

Dans tous les cas des précautions doivent être prise car la multiplication du matériel biologique sur hôte naturel n'exclut pas le risque de pollution par l'ADN autre que l'ADN cible ; il serait à l'origine d'erreurs d'analyses génétiques, par amplification de cet ADN contaminant (Anonyme, 1996 b ; Anonyme, 1999).

I.3 - Les marqueurs moléculaires utilisés en génétique des populations de pathogènes

L'ADN à l'état pur et en quantité suffisante, est une condition préalable pour toutes les étapes des protocoles de biologie moléculaire. Ainsi, l'extraction d'ADN est donc une étape incontournable.

Les méthodes d'extraction peuvent être classées en deux grandes catégories : la première inclut les techniques de purification d'ADN à partir de plasmides et de bactériophages ; la seconde comporte les procédés d'extraction réalisés à partir d'ADN génomique des procaryotes ou des eucaryotes (Anonyme, 1996 a).

Quel que soit le type de cellules à partir desquelles l'ADN est extrait, le principe des techniques d'extraction de l'ADN génomique est sensiblement le même. Il faut d'abord lyser les cellules, dégrader les membranes, les parois et les protéines, ensuite dégrader les ARN, séparer l'ADN des autres composés et purifier l'ADN obtenu.

Parmi les techniques d'analyse les plus utilisées en génétique des populations, la RAPD, l' AFLP, et la SSR, sont les plus couramment citées (Cataeno – anoles, 1998).

I.3.1- Les marqueurs RAPD

Parmi les techniques de marquage développées figure la RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA). Elle est basée sur la PCR et utilise des amorces non spécifiques pour amplifier une gamme de fragments d'ADN similaires à ceux qui sont générés par la RFLP (Saiki, 1985). La réaction d'amplification nécessite une quantité d'ADN, une DNA polymérase thermostable, une amorce, des dNTP, un tampon de réaction, du magnésium et autres additifs (Williams et al., 1990). La RAPD est intéressante dans la mesure où elle ne nécessite pas de grandes quantités d'ADN (Burdon,1993).

En dépit du caractère dominant de la presque totalité de ces marqueurs (Williams et al.,1990), de la co-migration des fragments d'ADN et de la variation dans l'intensité des bandes, sur gel de révélation(Burdon,1993), la RAPD a montré une grande efficacité dans l'analyse de la diversité génétique des organismes biotiques. C'est ainsi qu'elle a été beaucoup utilisée pour la caractérisation moléculaire des champignons (Metzenberg,1991) ; *Neurospora* a été le premier matériel fongique analysé (Williams et al .,1990). Cette technique a été par ailleurs très efficace dans l'analyse de la variabilité génétique des isolats des pathogènes biotrophes comme les agents d'oïdium (Mac Donald,1997) et les agents de rouilles des genres *Coronartium* (Doudrick et al .,1993), *Melampsora* (Pei et al .,1997), *Puccinia* (Chen et al .,1993) et *Uromyces* (Macclean et al .,1995).

I.3.2- Les microsatellites ou marqueurs SSR

Se sont des séquences d'ADN répétitives en tandem de 2 à 5 nucléotides. Ces petites séquences qui se répètent tout le long du génome, sont à la base de marqueurs génétiques multialleliques et dominants, détectés aux moyens d'amplifications par PCR. En effet les régions flanquantes de ces microsatellites sont généralement conservées au niveau du génome d'une même espèce. Ainsi on utilise des amorces spécifiques correspondant à ces régions flanquantes pour l'amplification de ces séquences répétitives qui exhibent un polymorphisme, correspondant au nombre d'unités répétitives par génome (Cregan et al .,1998).

Au début, les marqueurs microsatellites appelés aussi SSRs (Simple Sequences Repeats marqueurs), ont tout d'abord trouvé leur application en génétique humaine (Hundson et al.,1995 in Cateno-anoles et al., 1998), puis en phylogénétique (Akkaya et al .,1995 ; Lu et al.,1996 et Siniar et al.,1996 in Cateno-anoles et al., 1998) et bien après en phytopathologie fongique. En particulier, des études génétiques ont été réalisées sur les modèles *Ascochyta rabei* (Geistlinger et al .,1997) et *Phialophora gregaria* (Chen et al ., 2002). Des recherches récentes sont menées pour l'identification de séquences répétitives, sur des modèles appartenant aux *Pucciniaceae* (Keiper et al .,2003).

I.3.3- Les marqueurs AFLPs

L'AFLP (Amplified Fragment length polymorphisme) est une technique basée sur l'utilisation simultanée de la PCR et des enzymes de restriction. Elle consiste en une amplification sélective par PCR de fragments issus de la digestion de l'ADN génomique, par l'utilisation de deux enzymes de restriction, coupant respectivement chaque 4 et 6

paires de bases (Vos et Kuiper,1998 et Vos et *al.*,1995). Cette technique a été d'abord utilisée en cartographie génétique des plantes (Vos et *al.* ,1995), puis adaptée à l'étude de la variabilité inter et intra spécifique chez les champignons phytopathogènes. Mager et *al.*, (1996) cités par Vos et kuiper, (1998), ont pu conclure que l' AFLP était un bon marqueur de diversité génétique appliqué aux champignons. Ces mêmes marqueurs ont permis de distinguer entre les différentes espèces de rouilles des céréales (Keiper et *al.*, 2003) et les différents individus d'une population de rouille appartenant à l'espèce *Melampsora epityiae*(Hurtado et Ramsedt, 2002).

Chapitre II.Matériel et méthodes

II.1- Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour le pouvoir pathogène est constitué par 3 cultivars de fève (*Vicia faba major*) et 3 de féverole (*Vicia faba minor*), dont le comportement variétal vis-à-vis de la rouille avait déjà été testé (Ait Issa et Aziri, 1999). Ils proviennent tous de la station régionale ITGC de Oued smar, et leur origine et provenance figure dans le tableau 2 :

Le cultivar 18009 s qui a montré une plus grande sensibilité à la rouille (Ait Issad et Aziri., 1999), a été utilisé pour la purification et la multiplication des isolats, ainsi que pour le test du pouvoir infectieux des urédospores, après conservation.

II.1.1- Obtention des plants

Les plants de fève/ féverole destinés à l'inoculation, ont été obtenus à partir de semences triées à la main, puis désinfectées pendant 5 minutes à l'eau de javel 2°. Les graines ont ensuite subi 3 rinçages successifs, puis ont été mises à germer dans des boîtes de Pétri et disposées entre deux feuilles de papier buvard humidifiées et incubées à environ 20°C.

Les semences ayant germé, ont été repiquées dans des petits pots, contenant un mélange de sol et de matière organique préalablement stérilisés, dans les proportions de 2 /3 et de 1/3. Les plants sains ont été sélectionnés et retenus pour la réalisation du test du pouvoir pathogène ou pour d'autres inoculations artificielles.

II.2- Matériel fongique

Le matériel fongique utilisé au cours des expérimentations est constitué de 11 isolats d' *Uromyces viciae- fabae*, tous issus de plants de fèves infectés par la rouille et récoltés durant des prospections effectuées au printemps 2002 et 2003, dans les régions du centre et de l'est du pays ; le plus grand nombre (8 isolats), provient du centre et deux isolats proviennent de l'est. En plus de ces dix isolats algériens, un seul provient de Tunisie. Nous n'avons pu obtenir d'isolats représentant la région ouest du pays, en raison du climat qui a régné (étage bioclimatique semi-aride) et où la rouille sévit rarement.

II.2.1- Collecte des échantillons

De chaque site, une quantité suffisante d'échantillons présentant des symptômes de rouille a été récoltée. Celle-ci a été conservée à 4°C (Clement et al .,1993 a et b ; Wagner et al .,1993), et à -20°C (Pruter et al.,1992). La conservation de ces urédospores est faite dans des tubes Eppendorf. Avant son utilisation, chaque isolat a subi les étapes suivantes :

II.2.2- Purification des isolats à partir d'une seule pustule

Théoriquement, chaque pustule proviendrait d'une seule urédospore (Messiaem, 1981). Ainsi, la purification des isolats de rouille, a été réalisée, selon la technique décrite déjà par Ait Issad et Aziri ,(1999).

Les urédospores récoltées d'un même champ ont été inoculées sur une variété sensible de fève pour constituer des isolats pré-purifiés. À cet effet, une suspension de spores diluée à la concentration d'environ 1000 spores / ml est préparée (1 000 spores / ml, au lieu de 20 000 à 50 000 préconisées pour obtenir des pustules très éparses et éviter ainsi, la contamination par d'autres isolats lors de la purification, voir ci-après). Sept jours après inoculation par pulvérisation d'une suspension de spores, des pustules individuelles distantes l'une de l'autre apparaissent. Une pustule est prélevée pour chaque isolat avant son ouverture, puis celle-ci a été inoculée par l'étalement de son contenu à l'aide d'une lame de rasoir préalablement stérilisée, sur de jeunes plantules âgées de 21 jours (fig. 2 a, b , c).

Les plantules ainsi inoculées sont recouvertes par une cloche (sac plastique) pendant 72 h pour maintenir une humidité saturante (100% Hr) et éviter par la même, le risque de contamination par d'autres isolats également en cours de purification.

L'humidification des cloches et de l'atmosphère environnante est obtenue par capillarité (Ait Issad et Aziri, 1999) .

Les plantules inoculées sont incubées dans des conditions optimales de température et de photopériode (20 °c et 16 à 18 h de lumière).

Après une incubation de 5 jours, lorsque les ébauches de pustules commencent à se manifester, les cloches sont alors retirées et l'humidification est continuée par pulvérisation d'eau, jusqu'à l'apparition de pustules sporulantes.

II.2.3- Multiplication des pustules purifiées

Les pustules issues de la purification ont été multipliées à leur tour sur une variété de fève sensible, jusqu'à obtention d'une quantité suffisante de spores pour les manipulations ultérieures :

Inoculations pour l'étude du pouvoir pathogène,

Extractions d'ADN,

Mensuration des urédospores,

Etude de la viabilité et du pouvoir infectieux des spores.

Les urédospores des différents isolats ainsi multipliées, sont récoltées par grattage des pustules (environ 100mg de spores / isolat) et stockées à -20° C dans des Eppendorfs. L'origine géographique des isolats étudiés est mentionnée dans le tableau 3.



b

c

Fig. 2 : Purifications des pustules

a) Pustules avant ouverture

b) Prise de la pustule à l'aide d'une lame de rasoir stérilisée

c) Etalement de la pustule sur feuille à inoculer

Tableau 3 : Origine géographique des isolats

Isolats	Hôte d'origine	Origine	Année d'isolement
UVF1	Fève	Tizi ousou	2002-2003
UVF2	Fève	Rouiba (W.Alger)	2002-2003
UVF3	Fève	Boumerdes	2002-2003
UVF4	Fève	Boudouaou (W.Boumerdes)	2002-2003
UVF5	Fève	INA El harrach (W.Alger)	2002-2003
UVF6	Fève	Baba hassan (W.Alger)	2003-2004
UVF7	Fève	Ain Benian (W.Alger)	2003-2004
UVF8	Fève	Tunisie	2002-2003
UVF9	Fève	ITGC Oued Smar(W.Alger)	2002-2003
UVF10	Fève	Constantine	2003-2004
UVF11	Fève	Skikda	2002-2003

II.3- Etude du polymorphisme par les marqueurs morphologiques

La variabilité morphologique a été pendant longtemps l'un des indicateurs privilégiés de la diversité des populations.

II.3.1- Mensuration des urédospores

La mensuration des urédospores est réalisée sur les 11 isolats d'*Uromyces viciae-fabae* pour lesquels une estimation des dimensions (L) et (l), représentant successivement le grand et le petit diamètre des urédospores, a été faite à l'aide d'un microscope préalablement étalonné. Une estimation du pourcentage de la forme ronde par rapport à la forme ellipsoïde a été également déterminée.

Pour une meilleure évaluation de la différence probable existante entre les 11 isolats,

l'analyse a porté aussi sur le rapport (L/I).

II.3.1.1- Longueurs et largeurs moyennes des spores

Les mensurations ont porté sur 100 urédospores prises de façon aléatoire (100 urédospores / isolat).

II.3.1.2- Formes des urédospores

Le pourcentage des deux formes d'urédospores a été également évalué à partir du dénombrement au hasard des spores. Les opérations de mensuration ont été répétées trois fois.

II.3.1.3- Analyse statistique par le test de parallélisme

L'analyse statistique représentée par le test de parallélisme, dont le principe est basé sur la comparaison des pentes des droites $L=f(I)$ (Mather, 1965), a permis de comparer les résultats des différentes mensurations.

II.3.2- Etude du pouvoir germinatif et infectieux des urédospores d '*U. viciae fabae*

Cette étude a été réalisée dans le but de détecter une éventuelle variabilité dans le comportement écologique des différents isolats d'*U. viciae- fabae* pour le pouvoir germinatif et pour le pouvoir infectieux des urédospores, et par la même étudier la durée de viabilité et du pouvoir infectieux de ces spores.

A cet effet, les urédospores ont été conditionnées pour chaque isolat, dans des tubes Eppendorf de 1ml, immédiatement après la récolte et conservées respectivement à - 20° C, 4°C et à la température ambiante (environ 18°C).

II.3.2.1- Estimation du pouvoir germinatif et infectieux des urédospores

Des échantillons d'urédospores ont été prélevés pour chaque isolat et pour chaque température de conservation. Chaque échantillon est divisé en deux, dont l'un a subi un lavage, puis une incubation à 20°C pour germer, et l'autre mis directement à germer. Les deux échantillons ont également servi d'inoculum pour infecter des plants de fève sensibles. Des échantillons d'urédospores fraîchement récoltées, représentant les 11 isolats et dont le pouvoir germinatif a été immédiatement estimé, ont servi de témoins tout le long de cette étude expérimentale

II.3.2.2- Description du dispositif de lavage des urédospores

Le lavage des urédospores a été réalisé à l'aide d'un dispositif original conçu dans notre laboratoire et adapté spécialement pour la réalisation de l'étape de lavage. Celui ci est constitué par un appareil de perfusion relié à une source d'eau distillée froide (0°C)(fig. 3). L'eau passe dans la chambre de lavage à une vitesse d'environ 2 ml/min pour se

déverser dans un récipient, éliminant ainsi les substances inhibitrices. Le lavage des spores est effectué pendant 12h (Wagner et *al.*, 1993), à l'obscurité dans le réfrigérateur.

La germination des urédospores s'est faite dans une goutte d'eau au fond d'une lame creuse, scellée au moyen d'un vernis à ongle transparent pour éviter l'évaporation. La lame est incubée pendant 4h à la température optimale de 20°C pour initier une germination (Joseph, 1997).



Fig. 3 : Dispositif adapté au lavage des urédospores

II.3.2.3- Détermination du pourcentage de germination des spores

Afin de déceler une éventuelle germination des spores, des observations sous microscope au grossissement GX400, ont été effectuées d'une façon hebdomadaire pour les deux premières observations, puis mensuelle jusqu'à ce qu'il n'ait plus de réponse (germination). On considère qu'une spore a germé lorsque son tube germinatif a atteint le plus petit diamètre de la spore. Pour chaque isolat et à chaque température de conservation, on compte le nombre de spores germées pour cent spores observées.

II.3.2.4- Evaluation du pouvoir infectieux des isolats

Le pouvoir infectieux des spores est estimé avant et après leur lavage en procédant à une inoculation artificielle des plants de fève de la variété sensible « 18009 s ». Les plants inoculés ayant montré les symptômes caractéristiques, sont notés par le signe (+) et dans le cas contraire, par le signe (-).

II.3.2.5 - Analyse statistique

Le test basé sur l'analyse de la variance a été utilisé pour l'analyse statistique des résultats par le logiciel STATISTICF.

II.4- Technique d'étude du polymorphisme génétique par les marqueurs RAPD.

II.4.1- Obtention de L'ADN

L'ADN génomique a été obtenu par extraction, à partir des urédospores, préalablement purifiées et stocké à -20°C. À cet effet, 3 protocoles d'extraction ont été expérimentés afin d'optimiser les conditions d'extraction, à savoir le protocole SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), le protocole CTAB (Cehtyl Trimetyl Ammonium Bromure) et le protocole SDS / CTAB (Annexe 3).

II.4.1.1- Optimisation des extractions d'ADN

20mg d'urédospores ont été utilisés pour les extractions d'ADN par les 3 protocoles. Pour chaque protocole testé, un broyage des urédospores est réalisé en présence d'un abrasif, d'azote liquide (Edwards et *al.*, 1999) et de quelques microlitres de peroxyde d'hydrogène. Le sable ayant servi d'abrasif, est traité auparavant avec du peroxyde d'hydrogène pour le débarrasser des résidus de matière organique, puis décalcifié par utilisation d'HCL (pour ne pas interférer avec les produits utilisés dans les extractions) et enfin stérilisé dans une étuve à 105°C. L'extraction finale est décrite en page 28.

Une quantité de PVP(Poly vinyl Pyrolydon) a été rajoutée au tampon d'extraction en prévention des oxydations éventuelles des extraits d'ADN.

Les étapes les plus importantes de ces protocoles d'extraction sont : la lyse des cellules, la précipitation des protéines à l'éthanol (pour les protocoles SDS) ou l'extraction par le complexe chloroforme / alcool iso amylique (pour les protocoles CTAB). Après ces étapes, l'ADN est obtenu en pelote ; celle-ci est lavée à l'éthanol froid, puis resuspendue dans un tampon à base de TRIS-EDTA (TE). Les extraits d'ADN ainsi obtenus sont conservés à 4 °C jusqu'à leur analyse par RAPD.

II.4.1.2- Visualisation de l'ADN sur gel d'électrophorèse

Les extraits d'ADN ont été mélangés à un tampon de charge (5µl d'ADN + 7µl de tampon de charge) dont la composition Figure en annexe 3. Pour visualiser l'ADN, un gel d'agarose à 0.6% a été préparé. À cet effet 360 mg d'agarose ont été dissoutes dans un Erlen contenant 60 ml (pour la petite cuve à électrophorèse) de TAE 1X (Tris- Acetate-EDTA). Afin de permettre une dissolution homogène, la suspension est chauffée jusqu'à ébullition dans un four micro-onde. L'Erlen refroidi pour y ajoute 2µl de bromure d'ethidium (BET à 0.5µg / ml). La suspension a été ensuite versée dans le support de gel de la cuve à électrophorèse, dont les deux extrémités ont été soigneusement fermées par du ruban adhésif et dans lequel un peigne a été préalablement disposé. Le gel ainsi préparé, a été laissé pendant 2 heures pour polymériser à la température ambiante. Après polymérisation, le ruban adhésif et le peigne ont été enlevés et le gel a été ensuite plongé dans 350 ml de TAE 1X, contenus dans la petite cuve à électrophorèse. Les extraits d'ADN en solution dans le tampon de charge (12µl), ont été déposés un à un dans les puits laissés par le peigne sur le gel, puis le gel a été soumis pendant 30 minutes, à un champ électrique de 100 volts. La révélation de la présence de la bande caractéristique d'ADN s'est faite sous un trans-illuminateur à ultraviolet.

II.4.1.3- Détermination de la concentration de l'ADN

La quantification de l'ADN a été réalisée selon deux méthodes :

- **Spectrophotométrie** : Cette technique consiste à quantifier l'ADN par mesure de la densité optique. En effet, l'ADN absorbe les UV à 260 nm, tandis que les protéines absorbent les UV à 280 nm. Ce qui nous permet d'estimer la quantité de cette ADN avec l'absorbance à 260 et sa qualité, grâce au rapport : absorbance à 260 / absorbance à 280. Pour cela, 10 µl d'ADN ont été dissous dans 1990 µl d'eau distillée et exposés dans un spectrophotomètre, aux précédentes longueurs d'ondes, pour déterminer les absorbances respectives de ces deux longueurs d'ondes. La concentration en ADN est obtenue par la formule suivante :

$$\text{ADN } (\mu\text{g} / \mu\text{l}) = \text{DO } 260 \times 200 \text{ (facteur de dilution)} \times 50\mu\text{g} / \text{ml} \times 10^{-3}$$

- **Electrophorèse des extraits d' ADN en présence d'une gamme étalon d'ADN** : Les concentrations en ADN des différents extraits ont été déterminées par dépôt de 12µl d'une solution contenant 5 µl d'ADN + 7 µl de tampon de charge, dans les puits d'un gel d'agarose à 0.6 % (0.36g d'agarose dans 60ml de TAE), en présence d'une gamme de concentration d'ADN de 50ng / µl, 100ng / µl, 150ng / µl et 200ng / µl et d'un marqueur de poids moléculaire (1Kb ladder). Les concentrations en ADN des échantillons sont déterminées par leur comparaison à l'intensité de la coloration de la gamme connue de concentration. Celles-ci sont exprimées en µg/µl.

II.4.1.4- Extraction finale

Les 11 isolats ont subi une extraction finale, dans la quelle la quantité d'urédospores a été portée à 100mg pour obtenir des quantités plus importantes d'ADN et permettre ainsi d'optimiser les amplifications. Les extraits d'ADN obtenus par le protocole SDS/CTAB ont été dilués à environ 10ng/µl. Ces ADN dilués ont été stockés à 4°C en aliquotes jusqu'à leurs utilisations ultérieures par RAPD.

II.4.2- Mise au point des paramètres de la RAPD

L'analyse génétique par RAPD a porté sur le matériel génomique des 11 isolats d' *U. viciae-fabae* dont l'ADN a été préalablement purifié.

II.4.2.1 - Préparation du milieu réactionnel (MIX)

Une dilution des extraits a été réalisée pour obtenir une concentration de 10 ng / µl. C'est ainsi qu'en prélevant 1,5µl on aura 15ng d'ADN dans le mix ; ce qui nous a permis d'être dans la fourchette optimale de concentration en ADN . Celle-ci étant définie entre 5-25 ng (Rafalki, 1998).

Les réactifs ainsi que leur concentrations respectives dans le mix sont représentés

dans le tableau 4.

Les amplifications ont été réalisées avec 15 amorces (Operon Technologie, Alameda, CA, USA), des séries OPA, OPB, OPC, OPE, OPAE et OPK, dont les séquences sont les suivantes:

OPA 17 : 5' -GACCGCTTGT-3'

OPB 1 : 5' -GTTTCGCTCC-3'

OPB 2 : 5' -TGATCCCTGG-3'

OPB 7 : 5' -GGTGACGcAG-3'

OPB10 : 5' -CTGCTGGGAG-3'

OPB 15 : 5' -GGAGGGTGTT-3'

OPB 18 : 5' -CCACAGCAGT-3'

OPB 20 : 5' -GGACCCTTAC-3'

OPC 8 : 5' -TGGACCGGTG-3'

OPC 10 : 5' -TGTCTGGGTG-3'

OPC 13 : 5' -AAGCCTCGTC-3'

OPE 15 : 5' -ACGCACAACC-3'

OPK 16 : 5' -GAGCGTCGAA-3'

OPAE 7 : 5' -CTGAAGCGCA-3'

OPAE 10 : 5' -CTGAAGCGCA-3'

II.4.2.2 - Réaction d'amplification

L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur programable PTC 100 (Peltier Thermal. Cycler) de M . J. Reseach, selon le protocole de Munoz et *al.*, (2002).

Le programme d'amplification a été réalisé comme suit :

La première étape a été réalisée en trois cycles de : 60 secondes à la température de 94 °C pour la dénaturation de l'ADN double brin, 60 secondes à 37 °C pour l'hybridation des amorces et 80 secondes à 72 °C pour l'élongation. La seconde étape a été faite en trente cinq cycles de : 40 secondes à 94 °C, 40 secondes à 40 °C et 80 secondes à 72°C. Une extension finale de 5 minutes à 72 °C en fin de programme.

II.4.2.3 - Electrophorèse des amplifiats, sur gel d'agarose

Les produits de l'amplification ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2 %, dans du TAE à 1%. À cet effet, 12 µl d'une solution contenant 5 µl d'ADN amplifié + 7 µl de tampon de charge, ont été déposés dans les puits du gel. La migration est faite en présence d'un marqueur de poids moléculaire (1Kb ladder). La révélation s'est faite sous ultraviolet, après coloration du gel dans une solution de bromure d'ethidium. Les photographies ont été réalisées par un Polaroid et un appareil photo numérique. Les

diagrammes ont été obtenus grâce au logiciel « Corel Draw », en prenant en considération la présence ou l'absence des bandes et intensité ainsi que l'épaisseur des bandes.

II.4.2.4- Analyse des profils et construction des dendrogrammes

L'analyse statistique des profils est réalisée par l'utilisation de deux logiciels, à savoir le Cross Checker V 2.91 et le NTSYS pc (V2.01, Exeter Software, Stoughton ; NY, USA). Le Cross Checker a servi à l'élaboration de la matrice sur la base de présence ou absence de bandes d'ADN. Il a également servi à la détermination de la taille de la bande, par comparaison de cette dernière au marqueur moléculaire (1 Kb ladder). Le NTSYS a permis la construction du dendrogramme, selon la méthode (UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic mean), en utilisant l'indice de Nei et Li.

II.5 - Analyse de la variabilité du pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène des isolats a été étudié dans le but de détecter une variabilité par une éventuelle interaction différentielle des isolats, avec les différents cultivars. Le comportement variétal de cette gamme de cultivars (Tabl. 2), a été déjà testé vis-à-vis d'isolats d'*U. viciae-fabae* ; le cultivar Giza Blanca a été utilisé comme témoin résistant (Ait Issad et Aziri, 1999).

II.5.1- Dispositif expérimental

L'expérimentation, a été réalisée selon le dispositif décrit à la figure 4. Par manque d'espace dans le phytotron, le dispositif a été mené en 4 étapes. Chaque étape est réalisée par l'inoculation de 3 isolats sur 6 cultivars de fève/ féverole, selon un dispositif en bloc aléatoire. Ce dispositif contient 54 unités, réparti en 3 blocs (R1, R2, R3) dans le sens du gradient de température (de haut en bas) (Fig . 4). Chaque bloc contient 18 blocs élémentaires, dont chacun est représenté par 2 plants préalablement sélectionnés

II.5.2 – Inoculation

L'inoculation des isolats sur la gamme de cultivars est réalisée par la pulvérisation d'une suspension d'urédospores préparée, à la concentration de $2-5 \times 10^4$ spores / ml. Pour chaque isolat purifié, une suspension de spores est mélangée dans environ 50 ml d'eau distillée stérile (quantité suffisante pour l'inoculation des plants du dispositif). Cette suspension est ajustée à la concentration sus citée, à l'aide d'une cellule de Malassez. Pour que les spores aient une dispersion homogène dans la suspension, une goutte de Tween 20 a été rajoutée.

Après inoculation, les plants de fève sont mis dans les conditions optimales de développement de la maladie, à savoir une température de 20°C et une photopériode de

16h / 8h. Les plants ainsi inoculés, ont été humidifiés par une saturation de l'atmosphère environnant les plants (intérieur des cloches) par capillarité (fig5).

II.5.3 – Notation et expression des symptômes

Après 15 jours d'incubation aux conditions optimales sus citées, une notation de la maladie est réalisée à l'aide de l'échelle de notation à 9 niveaux, décrite par Bernier et al (1984) et dont la description des différents niveaux de réaction de la fève à l'égard de la rouille figure dans le Tableau 5. Les degrés de la maladie sont représentés par l'indice d'attaque moyen (IAM) qui est donné par la formule suivante :

$$IAM = (1 \times f_1) + (3 \times f_2) + (5 \times f_3) + (7 \times f_4) + (9 \times f_6) / N$$

IAM = somme des degrés d'attaque / nombre de plant inoculés

IAM : indice d'attaque moyen.

F : nombre de plant pour chaque degré dans l'échelle de notation.

N : nombre total de plants inoculés.

Tableau 5: Présentation et description de l'échelle de notation

Echelle de notation	Réaction de la plante Hôte	Description de l'échelle
1	Très résistant	Peu ou pas de pustules
3	Résistant	Peu de pustules couvrant moins de 10% de la surface foliaire; peu ou pas de pustules sur tiges
5	Peu résistant	Pustules sur la totalité des feuilles couvrant 10 à 20% de la surface foliaire, rares pustules sur tiges
7	Sensible	Nombre élevé de pustules sur les feuilles couvrant 40 à 80% de la surface des feuilles, présence de quelques pustules sur tiges
9	Très sensible	Extension importante de pustules sur feuilles, pétioles et tiges couvrant 80 à 100% des surfaces foliaires ; des feuilles et quelques plantes mortes

Source Bernier et al (1984)

II.5.4- Analyse statistique et construction des dendrogrammes

L'analyse statistique basée sur l'analyse de la variance a été utilisée par le logiciel SATISTICIF. Afin de conforter les résultats statistiques, le test de classification hiérarchique selon le test UPGMA par le logiciel MVSP(MultiVariate Statistical Package)

a également servi à l'analyse de ces mêmes résultats.

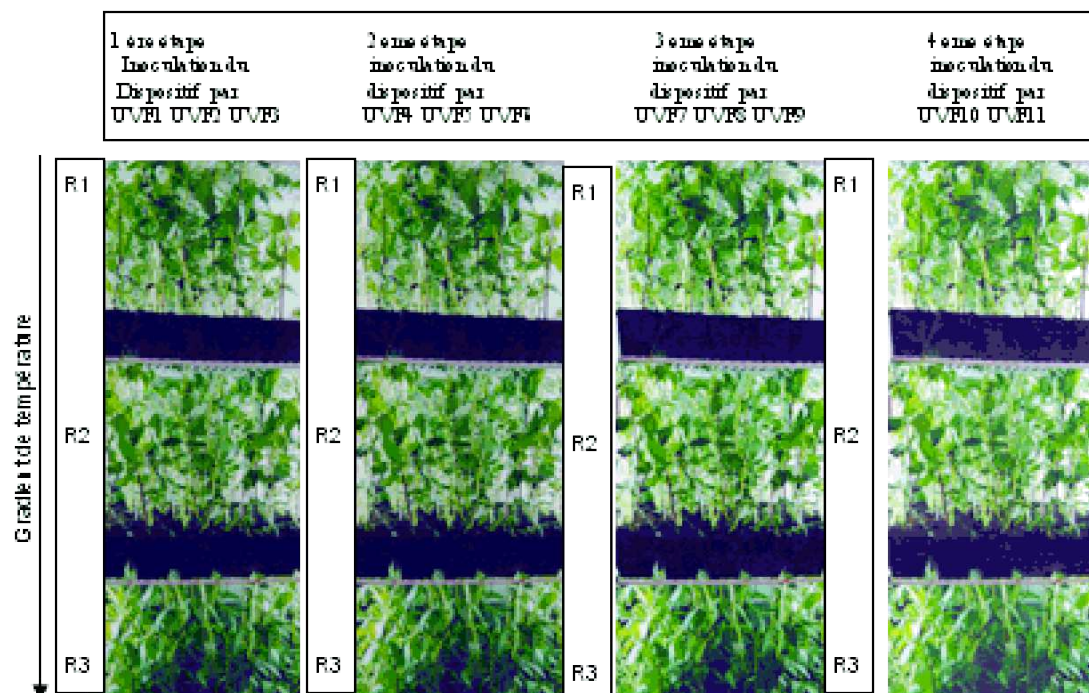


Fig 4 : dispositif expérimentale de l'étude du pouvoir pathogène



Fig. 5 : Humidification des plantes par capillarité

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1- Mise en évidence d'un polymorphisme par les marqueurs morphologiques (mensuration) et par l'étude de la durée de la viabilité et pouvoir infectieux des urédospores

III.1.1- Mensuration des urédospores

III.1.1.1- Présentation des résultats

La mensuration de la longueur et la largeur moyenne de 100 urédospores d'*U. viciae-fabae* donne respectivement, 26 - 27 x 21- 22.4 μm , pour les 11 isolats étudiés. L'analyse du rapport L/l a révélé des valeurs variant de 1.2 à 1.3, comme le montre le Tableau 6.

Isolat	Forme ellipsoïde				Forme ronde	
	Pourcentage moyen	Longueur Moyenne (L/ μm)	Largueur Moyenne (l/ μm)	L/l	Pourcentage moyen	Diamètre (μm)
Uvf1	25.00	26.30	21.30	123	75.00	23.50
Uvf2	23.20	27.53	21.10	129	76.80	23.40
Uvf3	22.65	26.41	21.50	122	77.35	23.52
Uvf4	25.01	27.91	21.16	131	74.99	23.96
Uvf5	23.00	28.00	22.00	127	77.00	23.54
Uvf6	21.54	27.75	22.30	124	78.46	23.33
Uvf7	22.44	27.33	21.00	130	77.56	23.23
Uvf8	24.62	26.92	20.96	128	75.38	23.25
Uvf9	24.11	27.03	21.14	127	75.89	23.52
Uvf10	25.32	27.20	22.40	121	74.68	23.32
Uvf11	22.90	26.03	21.30	122	77.10	23.10

Tableau 6 : Mensurations des urédospores

L'analyse statistique des deux variables longueur et largeur moyenne des urédospores, par le test de parallélisme (comparaison des droites $L=f(l)$, deux à deux pour tous les isolats), a donné les résultats présentés dans les tableaux 7 et 8.

Les pentes et les variances correspondant à chaque isolat sont très rapprochées, indiquant que les droites $L= f (l)$ sont plus ou moins parallèles et cela pour tous les isolats étudiés. Ainsi pour tous les isolats, le T observé est largement inférieur au T théorique (Tabl.8), indiquant que l'hypothèse de départ (existence d'une différence significative entre les isolats) est rejetée.

Les observations microscopiques des 11 isolats d' *U viciae fabae* ont montré l'existence d'urédospores de deux types bien distinctes, à savoir la forme ronde, avec notamment un pourcentage variant entre 75 et 78 % et la forme ellipsoïdale, avec un taux de 21 à 25 % (Fig. 6).



Fig. 6 : types et proportions d'urédospores de forme ronde et ellipsoïde (Gx100)

III.1.1.2--Discussion

Les dimensions obtenues par la mensuration des urédospores des 11 isolats de rouille récoltés sur des fèves /féverole manifestant des attaques par ce champignon, correspondent parfaitement aux dimensions d'*U. viciae-fabae* rapportées par Guyot, (1957) et Hariot, (1908) et confirmées par Ait Issad et Aziri, (1999).

Les mensurations de la largeur et la longueur des urédospores n'a révélé, quant à elle, aucune différence assez significative entre les 11 isolats de ce champignon. En effet, en comparant deux à deux les droites $L=f(l)$ correspondant à chaque isolat, le test de parallélisme n'a pas détecté de différence significative (Tabl. 7 et 8). Pour tous les isolats, le T observé est largement inférieur au T théorique, indiquant ainsi une grande similitude entre les droites $L=f(l)$ et par conséquent, une similitude entre les 11 isolats d'*Uromyces viciae-fabae*. Par ailleurs, l'analyse des rapports (L / l), a donné des résultats très rapprochés confirmant les précédentes observations.

Ces résultats confirment les données obtenues par Ait Issad et Aziri (1999) qui ont cherché une différence entre les isolats collectés sur la fève. Egalemment, Guyot (1957) a essayé de trouver une différence entre les isolats collecter sur les différentes espèces hôtes. Ce dernier a, de ce fait, affirmé n'avoir constaté aucune différence significative sur le plan morphologique quelque soit la plante hôte à partir de laquelle l'isolat a été récolté. Aucune différence assez significative n'est donc reconnue pour cette espèce, que ce soit pour les formes inter-spécifiques ou intra-spécifiques. Ces urédospores sont de structure très inégale ; ce qui a permis à Guyot, (1938) de les classer dans la section des *Crassi-Uromyces*. Une différence ultra - structurale pourrait néanmoins exister et par la même se manifester en microscopie électronique, comme c'est le cas dans certaines rouilles. En effet, une légère variabilité ultra-structurale a été mise en évidence pour les teliospores de *Puccinia menthae* (Edwards et al., 1999). Ces variations ultra- structurales des teliospores lorsqu'elles sont détectées peuvent servir de marqueurs morphologiques (Edwards et al., 1999).

Des mutations dans la couleur des spores de rouilles décelées périodiquement peuvent également, faire l'objet de marqueurs morphologiques pour l'étude de la diversité génétique de ce champignon (Burdon, 1993).

Par ailleurs, aucune variabilité n'a été détectée dans le pourcentage des deux formes d'urédospores. Pour tous les isolats, le pourcentage des formes rondes et ellipsoïdes est respectivement situé autour de 75 % et 25 %. Le type, urédospores de forme ronde, est particulièrement adapté au transport éolien, du fait de la négligeable résistance de friction à l'air de ces spores. Cette caractéristique les empêche de sédimenter, ce qui permet aux perturbations atmosphériques de les prendre en charge (Sache, 1995, 1994). Cette forte présence de la forme ronde est donc à l'origine de la très grande capacité de dissémination de ce champignon. La dissémination à longue distance de ces spores serait responsable de la diversité raciale des populations de cette rouille. Ainsi, elle serait comparable à la rouille noire, dont la capacité de dissémination est à l'origine du transfert de gènes d'une population à l'autre, voire même, d'un pays à l'autre (Rapilly, 1991)

III.1.2- Etude de la durée de viabilité et du pouvoir infectieux des urédospores d' *U. viciae-fabae*

III.1.2.1- Présentation des résultats

Les urédospores d' *U. viciae-fabae* placées dans des lames creuses scellées, germent normalement (Fig. 7). Cependant, le taux de germination de ces urédospores est tributaire de la durée de leur conservation et des températures auxquelles elles ont été exposées durant cette période de conservation. Les urédospores fraîchement récoltées ayant servi de témoin, ont montré une meilleure vitalité. En effet, pour tous les isolats, le taux de germination était d'environ 95 %.

Les données des observations ont servi à l'élaboration des tableaux 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 figurant en annexe 1 et à la construction sous EXCEL des histogrammes des figures 8, 9, 10, 11, 12, 13 et 14.

Les analyses statistiques par le test de la variance, ont révélé une différence non significative pour le facteur isolat (pas de différence entre les 11 isolats d'*U. viciae-fabae*) et ce quelle que soit la durée de conservation (annexe 2 Tab 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7). Quant aux deux autres facteurs, notamment la température (avec ses 3 niveaux T1 = -20°C, T2= 4°C et T3; température 18°C) et le traitement par lavage (avec ses 2 niveaux , AVL : avant lavage et APL : après lavage), l'analyse a montré une différence hautement significative. Elle a également révélé une différence significative, pour l'interaction entre ces deux derniers facteurs.

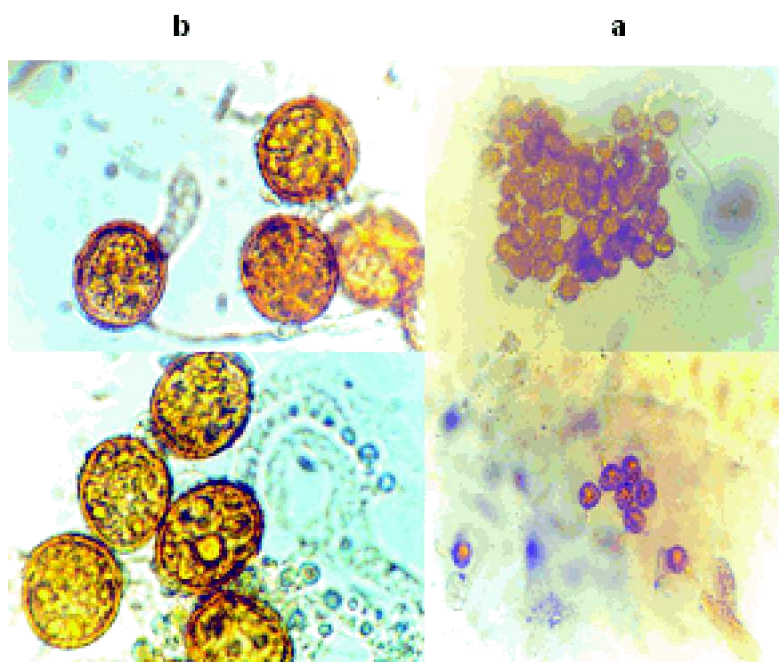


Fig. 7 : Germination des urédospores disposées en lames creuses

a) observation microscopique (Gx40)

b) observation microscopique (Gx100)

Le test de Newman et Keuls a révélé la présence de groupes homogènes bien distincts pour les facteurs ayant enregistré des différences significatives. Ainsi, la température de conservation se distingue avec 3 groupes dont chaque température constitue un groupe à part et le traitement par lavage, montre 2 groupes distincts. L'interaction entre ces deux facteurs a également révélé l'existence de groupes homogènes (Annexe 2, Tabl.8 à 16).

Les résultats ont permis donc de classer selon les facteurs étudiés, différents niveaux par ordre d'efficacité sur la durée de viabilité et du pouvoir infectieux des urédospores. Ainsi, les températures sont classées par ordre d'efficacité comme suit : T1(-20°C), T2(4°C) et T3(18°C) ; tous les traitements après lavage (APL) ont été plus efficaces par rapport au traitement avant lavage (AVL).

En effet, après une semaine de conservation aux températures de -20°C et 4 °C, les urédospores de tous les isolats ont révélé un taux élevé de germination, estimé respectivement à 90% et à 87% environ. Ces taux de germination des urédospores ont été améliorés par le lavage pendant 12h au moyen d'un courant d'eau distillée froide. Ainsi, un taux de 95% a été atteint pour les deux températures de conservation (Fig. 8). Ce taux élevé de germination s'est caractérisé par une bonne capacité d' infection des plants de fève inoculés, dont le pouvoir infectieux est noté dans les tableaux de l' annexe 1, par le signe (+) et matérialisé par des hachures sur l'histogramme de la figure 8.

Quant aux urédospores stockées à la température ambiante, elles ont perdu leur viabilité au bout d'une semaine. Après lavage à l'eau froide, celles-ci ont montré un très faible taux de germination, de l'ordre de 25 % uniquement et un effet légèrement appréciable sur le pouvoir infectieux (fig.8 et tabl.1 de l'annexe1). Après deux semaines,

les urédospores ont totalement perdu leur viabilité et leur pouvoir infectieux, malgré leur lavage à l'eau froide.

Après plusieurs semaines, les urédospores conservées à 4° C ont commencé progressivement à perdre leur pouvoir germinatif ainsi que leur capacité à induire des lésions symptomatiques. Le pouvoir infectieux s'est dégradé en particulier après 12 semaines de conservation, pour devenir nul après 16 semaines, bien que le pourcentage de germination soit respectivement supérieur à 50% (12 semaines) et à 20% (16 semaines).

Le lavage des spores a par ailleurs permis d'améliorer leur capacité germinative, en augmentant leur pourcentage de germination de 60% à près de 90% après 12 semaines (Fig12) et de 20% à 30% 16 semaines après. Cependant, dans ce dernier cas, le lavage n'a pas pu avoir d'effet sur le pouvoir infectieux des urédospores.

Au bout de 20 semaines de stockage, les spores conservées à – 20°C ont également subi une détérioration du pouvoir germinatif et du pouvoir infectieux. La viabilité est devenue nulle, malgré leur lavage à l'eau froide, qui a plus ou moins permis de restituer aux spores le pouvoir germinatif, mais sans toutefois avoir d'incidence sur le pouvoir infectieux (Fig. 14).

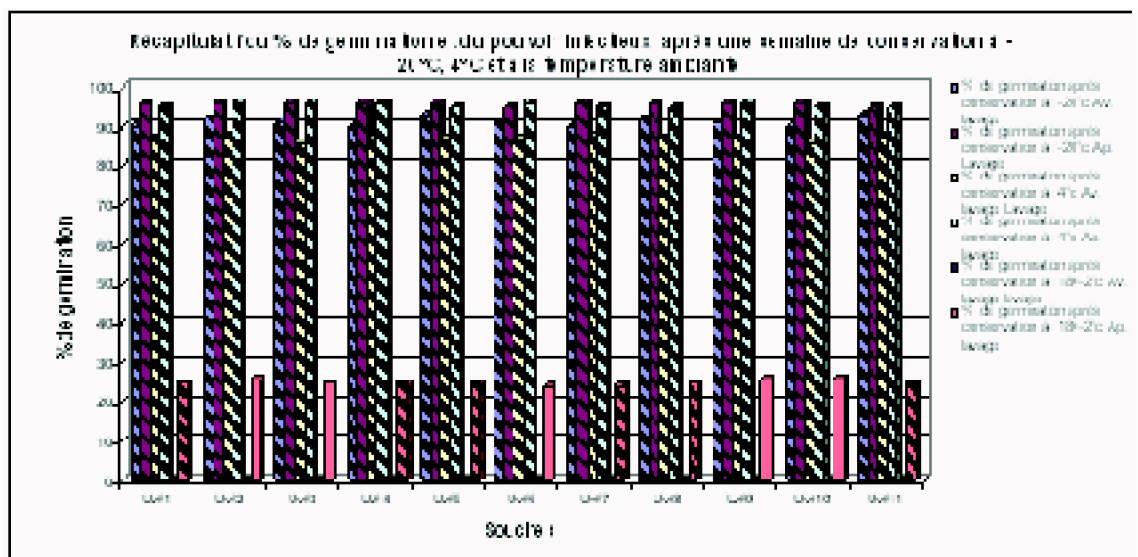


Fig. 8 : Pourcentage de germination des urédospores d'*U. viciae-faba* et leur pouvoir infectieux après une semaine de conservation aux températures de -20°C, 4°C et 18°C à 20°C (température ambiante)

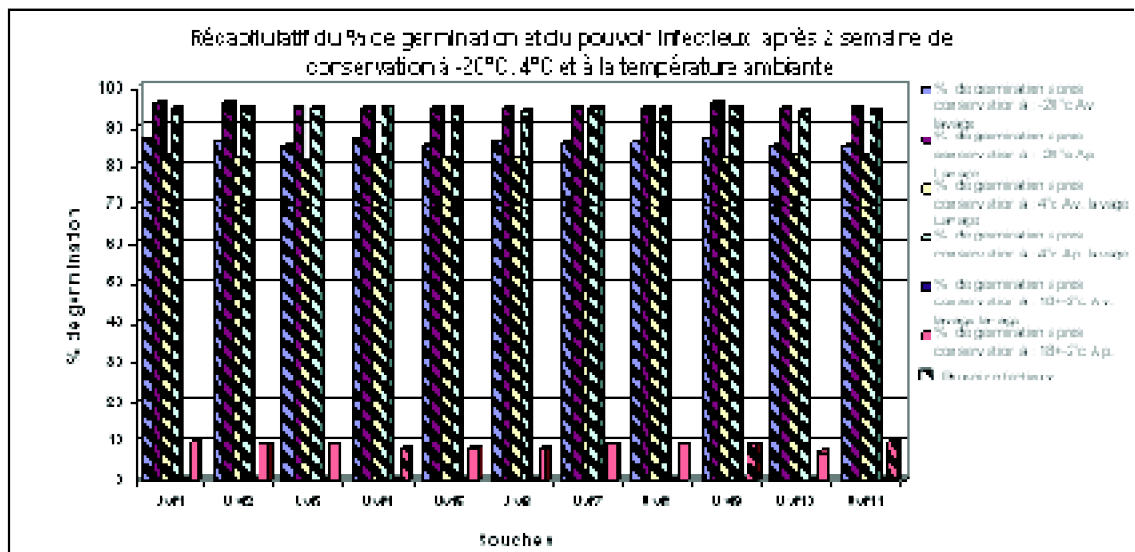


Fig. 9 : Pourcentage de germination des urédospores d'*U.viciae-faba* et leur pouvoir infectieux après deux semaines de conservation aux températures de -20°C, 4°C et 18°C à 20°C (température ambiante).

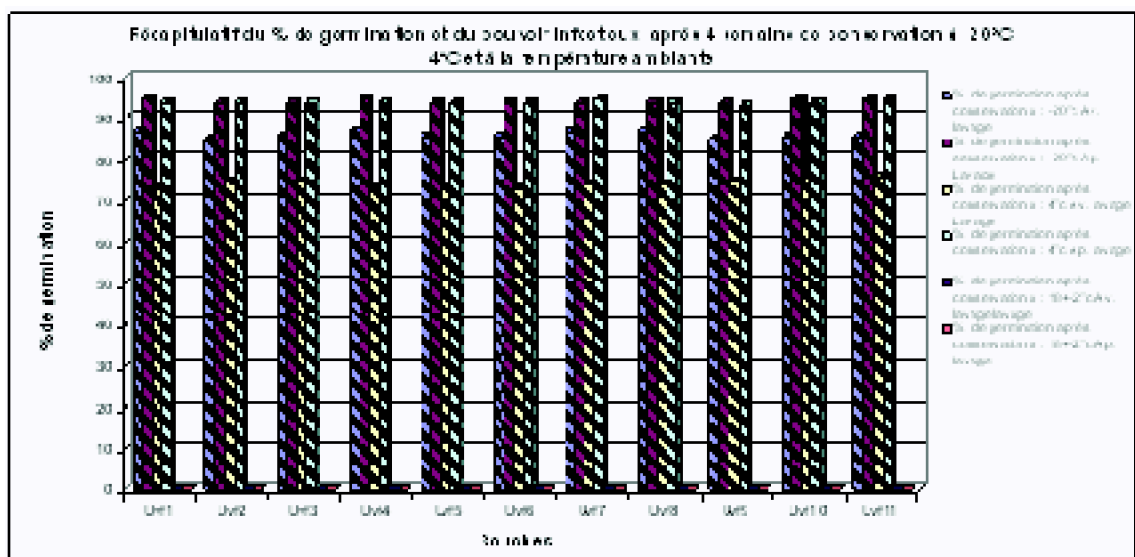


Fig. 10 : Pourcentage de germination des urédospores d'*U.viciae-faba* et leur pouvoir infectieux après quatre semaines de conservation aux températures de -20°C, 4°C et 18°C à 20°C (température ambiante).

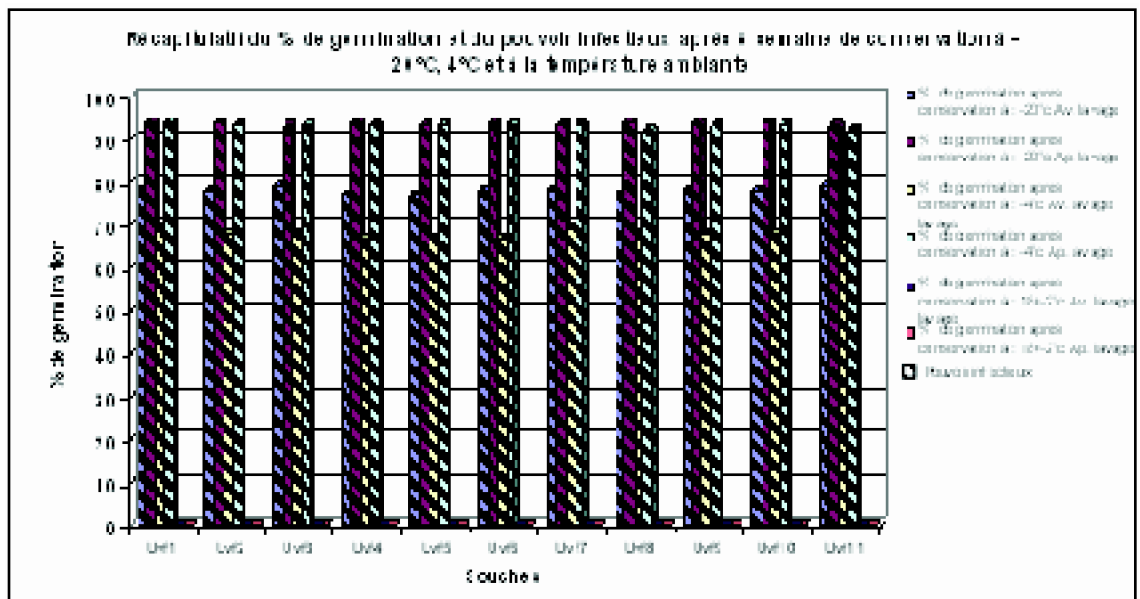


Fig. 11 : Pourcentage de germination des urédospores d'*U.vicia- faba* et leur pouvoir infectieux après huit semaines de conservation aux températures de -20°C, 4°C et 18°C à 20°C (température ambiante).

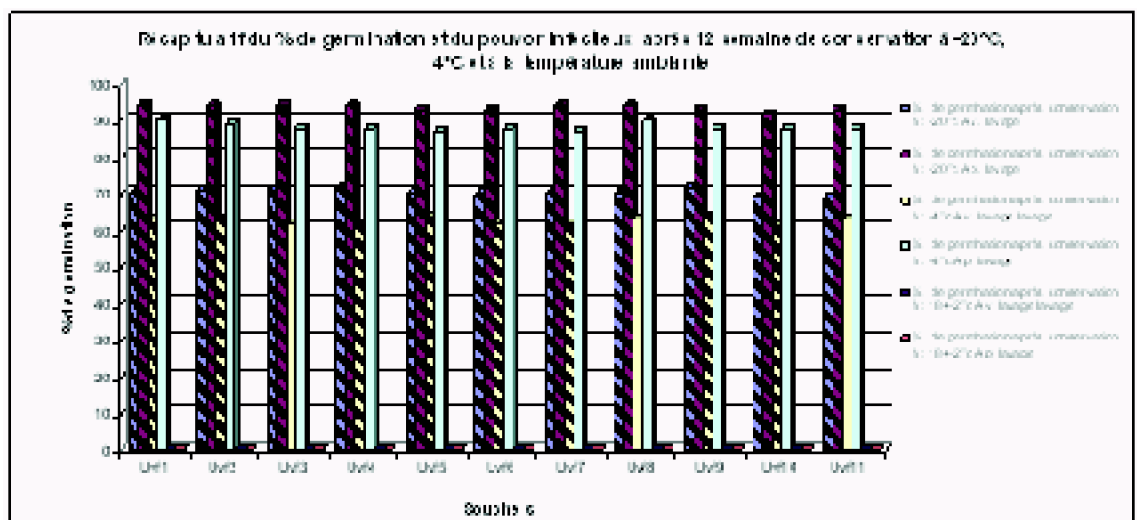


Fig. 12 : Pourcentage de germination des urédospores d'*U.viciae-faba* et leur pouvoir infectieux après douze semaines de conservation aux températures de -20°C, 4°C et 18°C à 20°C (température ambiante).

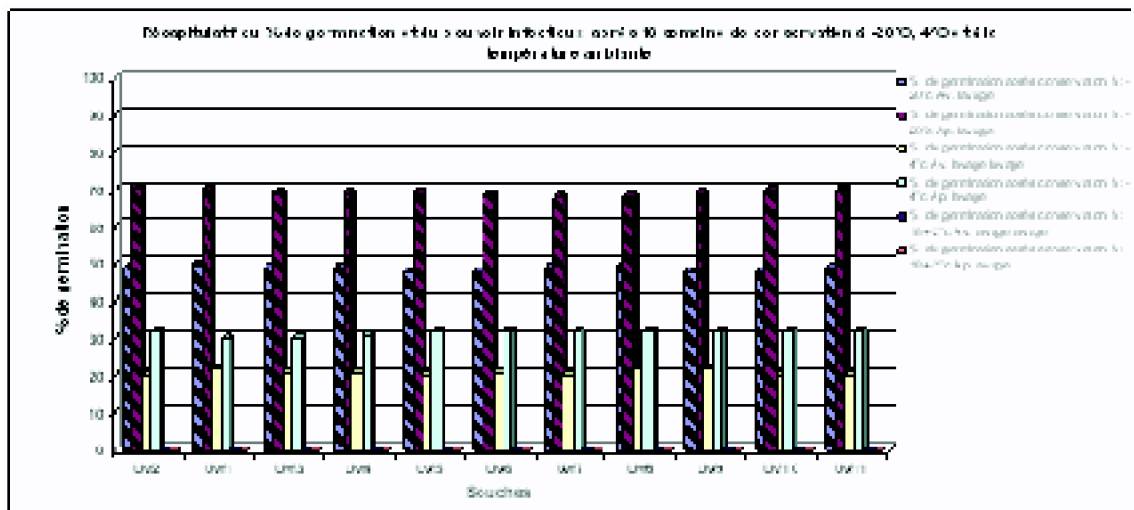


Fig. 13 : Pourcentage de germination des urédospores d'*U.viciae-faba* et leur pouvoir infectieux après seize semaines de conservation aux températures de -20°C, 4°C et 18°C à 20°C (température ambiante).

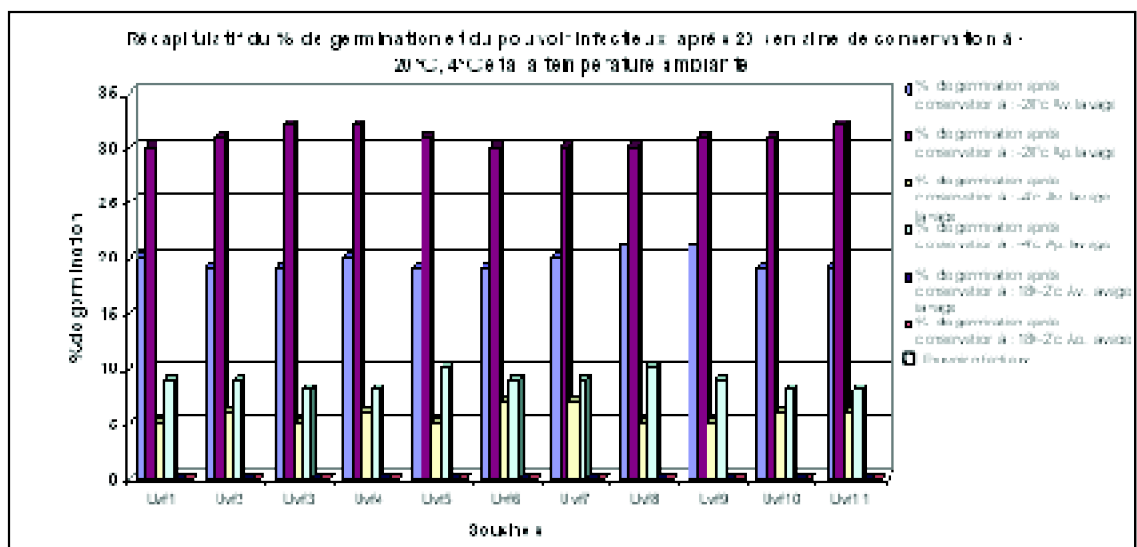


Fig. 14 : Pourcentage de germination des urédospores d'*U.viciae.faba* et leur pouvoir infectieux après vingt semaines de conservation aux températures de -20°C, 4°C et 18°C à 20°C (température ambiante).

III.1.2.1- Discussion

Après une semaine de conservation, les urédospores stockées à -20 et 4 °c ont gardé relativement leur pouvoir germinatif, estimé approximativement à 95% et 90%, comparé au taux germinatif des urédospores fraîchement récoltées (95 %). En effet, les spores de champignons biotrophes sont connues pour un potentiel métabolique bas se traduisant par une faible charge énergétique. Cet état offre à ce type de spores une longévité du pouvoir germinatif et infectieux, notamment lorsque ces urédospores sont exposées aux basses températures (Van- Hees -Boukema et Zodoks, 1986 ; Staples et Macko,1984 in

Wagner et *al.*, 1994). Ce potentiel métabolique réduit, caractérisant les spores de rouilles, est du aux conditions de déshydratation que subissent ces spores au cours du processus de maturation. La longévité du pouvoir germinatif et la capacité infectieuse sont aussi affectées par une exposition aux taux élevés d'humidité (Sussam et Douthite, 1973).

Par ailleurs, une exposition à certains aléas, tels que les rayons solaires (Clement et *al.*, 1998) et certaines conditions prévalant au cours de la sporogenèse, auraient également une action négative sur la viabilité des urédospores. A titre d'exemple les spores produites à une température dépassant les 25°C, auront un plus faible pouvoir germinatif par rapport à celles produites à 20°C (Schein et Rotem, 1965 et Schein, 1962). Cette détérioration de la viabilité est davantage accentuée à une longue exposition à ces aléas. Ceci est vrai pour la majorité des *Pucciniaceae*, notamment les espèces des genres *Puccinia* et *Uromyces* (Sache, 1995).

C'est ainsi que les spores âgées de ces espèces de rouilles, récoltées sur de vieilles feuilles, manifestent une importante chute de leur viabilité, comparativement aux urédospores récoltées fraîchement sur de jeunes feuilles (Zadok et *al.*, 1986 in Wagner et *al.*, 1993 et Imhoff et *al.*, 1981).

Sur le plan énergétique, durant les toutes premières phases d'activation de la germination des spores, particulièrement l'imbibition de celles-ci, il a été montré une activation de l'énergie métabolique représentée par l'ATP. Celle-ci est suivie en seconde étape par une production efficiente des 4 nucléosides-phosphates atteignant son maximum après 12 h d'imbibition. Cette accumulation des nucléotides suggérerait la préparation du métabolisme à la biosynthèse des protéines et des acides nucléiques (Wagner et *al.*, 1994).

Pour nombre de ces raisons, les spores ayant été conservées à la température ambiante auraient subi une perte du pouvoir germinatif exprimé, même après lavage, par le faible taux de 25% et auraient totalement perdu leur pouvoir infectieux au bout d'une semaine de conservation. Ces types de spores n'ont, de ce fait, pas pu induire de lésions sur les plants inoculés. En effet, les spores de rouille vieillissantes, en raison de la longue période de conservation et / ou des conditions inadéquates de stockage, subissent une réduction considérable dans le pool énergétique, notamment dans la fraction totale des nucléotides. C'est ainsi que le stockage d'urédospores pendant près de 3 mois à la température de 4°C a réduit le pouvoir germinatif de plus de 25% (Wagner et *al.*, 1993). Ces auteurs ont pu trouver une corrélation positive entre le ratio nucléosides / nucléotides et le pouvoir germinatif. Ils ont également remarqué une faible corrélation entre le ratio ATP / ADP et le taux germinatif et une corrélation négative entre la germination et le contenu des spores en nucléotides. Ces différents types de corrélation indiquent que l'énergie emmagasinée sous forme d'ATP n'est pas un paramètre important dans l'état énergétique des urédospores, tandis que les nucléosides seraient à l'origine du pool énergétique disponible au cours du processus de la germination.

Les urédospores stockées à 4°C ont pu survivre environ 3 mois, même avec une réduction de 30% de leur pouvoir germinatif, sans pouvoir causer d'infection. Par contre, celles qui ont été stockées à -20°C ont vu leur pouvoir infectieux réduit à zéro au bout de 5 mois de conservation et ce, malgré leur pourcentage de germination, estimé à environ

30%. Ceci est probablement dû au manque de réserves énergétiques des urédospores, représentées par les ratios nucléosides / nucléotides et ATP /ADP. Ces réserves seraient insuffisantes pour enclencher les événements succédant à la germination, à savoir, la formation d'appressoria, d'hyphes de pénétration et de mycélium intercellulaire. Dans le processus d'infection, ces trois étapes sont, avant la formation des haustoria, totalement tributaires du potentiel énergétique des spores (Heiller et *al.*, 1993). L'inefficience de la totalité des spores produites dans la même sore, serait également à l'origine du manque de vigueur de ces urédospores. C'est ainsi que parmi les urédospores fraîchement récoltées, 10% seulement auront la capacité de produire des pustules sporulant sur l'hôte inoculé (Sache, 1995). En raison de l'échelonnement dans le temps, de la production et de la maturation des urédospores, dans une même pustule, on peut ainsi trouver des spores mûres, des spores immatures et même de vieilles spores qui ont parfois atteint le stade téliospore.

Ainsi, le succès de l'infection par les urédospores dépend d'une efficience de la germination. Cette dernière est conditionnée par l'activation du métabolisme (Grabo et Wagner,1991) des accumulats emmagasinés au cours de la sporogénèse (Wagner et *al.*, 1993) et des conditions prévalant durant la maturation des spores (Sache,1995).

Le potentiel métabolique réduit des spores de rouilles, est en effet défini par les conditions sus citées. Il est également tributaire des conditions de déshydratation intervenant au cours de la sporogénèse (Sussam et Douthite,1973) et des substances inhibitrices de la germination, élaborées au cours du processus d'évolution des urédospores(Staples et Macko, 1984 ;Wolf, 1982 in Wagner et *al.*, 1993). La synthèse de ces auto- inhibiteurs est élevée à mesure que les urédospores sont conservées, notamment, en mauvaises conditions (Macko et *al.*, 1972)

En effet, la germination des urédospores est inhibée par ces substances émises dans le milieu environnant, lorsque celles-ci flottent en amas dense dans un milieu aqueux. C'est donc au moment de l'hydratation des urédospores qu'elles sont déversées dans le milieu environnant (Jones et Haburan, 1969 et Allen et *al.*, 1971). Ce sont pour la plupart des dérivés d'acide cinammomique, à savoir le 4-Hydroxy-3-methoxy cinnamate et le methyl 3-4-di methoxy cinnamate (Staples, 1968 et Staples et *al.*, 1962, in Macko et Staples, 1972) et pour certaines espèces, du methyl cis ferulate (Schroider et Hassebrank, 1964 in Macko et *al.*, 1972). En l'absence de ces substances, la germination commencerait par la digestion des parois, près du cytoplasme, allant progressivement vers la sortie du pore germinatif. Il semblerait donc que ces substances auto-inhibitrices ont une action sur les enzymes, responsables de la dissolution du pore germinatif (Samuel et *al.*, 1975)

Ces substances sont éliminées par simple lavage à l'eau froide (Macko et *al.*, 1972, Wagner et *al.*, 1993). Ce qui expliquerait le gain de vigueur enregistré, notamment, chez les échantillons ayant subi des lavages à l'eau distillée froide, quelque soient la température et la durée de conservation des spores.

Il est donc nécessaire de reconstituer les souches avant qu'elles ne perdent totalement leur vigueur. De préférence, après 4 mois de conservation à la température de -20°C (congélateur), ou bien avant et 2 mois de conservation à 4°C. Dans ces conditions,

lorsque les échantillons commencent à perdre de leur viabilité, il serait recommandé d'effectuer un lavage des spores à l'eau froide, pour éliminer les substances inhibitrices de la germination et permettre un gain de vigueur d'environ 25%.

Aucune variabilité entre les isolats n'a été détectée pour les 11 isolats étudiés. En effet, une diversité définie, par l'étude de la viabilité (pouvoir germinatif) et du pouvoir infectieux des urédospores est rare, pour les pathogène biotrophes. Ce type de pathogène montre rarement voir nullement de variabilité à cette échelle. Toutefois, une variabilité intra spécifique, exprimant différent niveau de sensibilité à certaines substances inhibitrices de la germination, a fait l'objet d'étude antérieures. Ainsi, la germination de la race 56 de *Puccinea tritici* serait profondément affectée par le methyl cis ferulate, tandis que la race 126-ANZ serait totalement indifférente à l'effet de cette substance (Schroïder et Hassebrank, 1964 in Macko et *al.*, 1972).

III.2 – Variabilité du pouvoir pathogène

III.2.1- Présentation des résultats

Les résultats du pouvoir pathogène par l'inoculation d'une gamme de cultivars par 11 isolats d'*Uromyces- viciae fabae* sont représentés dans les Tableaux 9, 10, 11.

Tous les isolats inoculés sur les 6 cultivars, ont révélé des lésions caractéristiques de la rouille de fève, exprimées par différents niveaux de réaction des cultivars (Fig. 15), comme l'indique les différents IAM (Indice d'Attaque Moyen) du Tableau 9 ; les cultivars ont montré des réactions qui diffèrent les uns des autres par différents niveaux de réaction (Tabl. 10 et Fig. 16.)

Sur la base de ces résultats, les isolats ont pu êtres classés en groupes, selon les niveaux de réaction des 6 cultivars vis-à-vis des 11 isolats d' *U . viciae- fabae* (Tabl.11)

Une différence par rapport à la période de latence et à la taille des pustules, a été observée notamment dans certains plants, appartenant aux cultivars Giza Blanca et Giza 402, comparativement aux autres cultivars(Fig. 17).

L'analyse des données par le logiciel STATICIF en utilisant le test statistique ANOVA a révélé les résultats figurant dans le tableau 16 (annexe 2)

Ces résultats relatifs aux deux variances étudiées, à savoir la variance isolats et la variance cultivars sont très hautement significatives, puisque leurs probabilités sont nettement inférieures à 1% (annexe 2 tab 16)mettant ainsi, en évidence une différence hautement significative dans la pathogénicité des isolats et dans la réaction des cultivars inoculés.

Le test de Newman et Keuls correspondant, a donné deux groupes homogènes des tabl. 17, annexe 2. Ce test a mis en évidence deux groupes homogènes ; le groupe A constitué uniquement par L'isolat UVF8, avec une moyenne de 4.63 et le groupe B

constitué par les autres isolats, avec des moyennes variant entre 2.15 et 3.20. Aussi, par l'analyse de ces moyennes, nous avons distingué les isolats du groupe B en deux sous groupes, dont le premier est constitué par les isolats UVF10 et UVF11, avec les moyennes respectives de 3.12 et 3.20 et le second regroupant le reste des isolats, avec des moyennes variant de 2.15 à 2.70.

TR : Très Résistant

R : Résistant

PR : Peu Résistant

S : Sensible



Fig. 15 : Symptômes typiques de la rouille



Fig. 16 : Différents niveaux de réactions sur quelques cultivars de fève inoculés par les isolats de rouilles

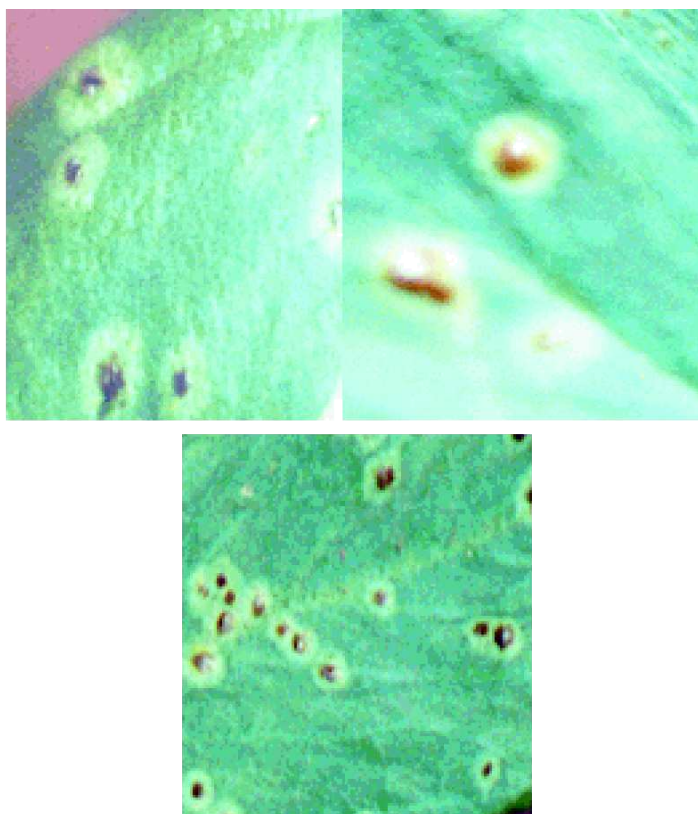


Fig. 17: Pustules de rouille obtenues sur différents géotypes

Le test statistique MVSP (Multi Variate Statistical Package 3.0), a permis d'obtenir la classification hiérarchique des isolats (Fig.18), montrant une nette séparation entre UVF8 et les 3 autre groupes ainsi qu'une étroite liaison entre UVF10 et UVF11. Les groupes obtenus au seuil de coupure de 50% sont :

- G1 : UVF8.
- G2 : UVF6, UVF1, UVF7, UVF3, UVF9 et UVF4.
- G3 : UVF5.
- G4 : UVF11 et UVF10.

Par ailleurs, les cultivars ont été groupés selon leur réaction vis à vis des isolats, en deux groupes bien distincts ; le groupe A avec un seul représentant en, le cultivar Mziraa, avec une moyenne de 3.79 et le groupe B comprenant les cultivars Giza 402, 18009S, Giza blanca et New mamouth, avec des moyennes variant entre 2.37 et 2.61 ; le troisième groupe intermédiaire AB, avec une moyenne de 3.06 (anova, annexe 2)

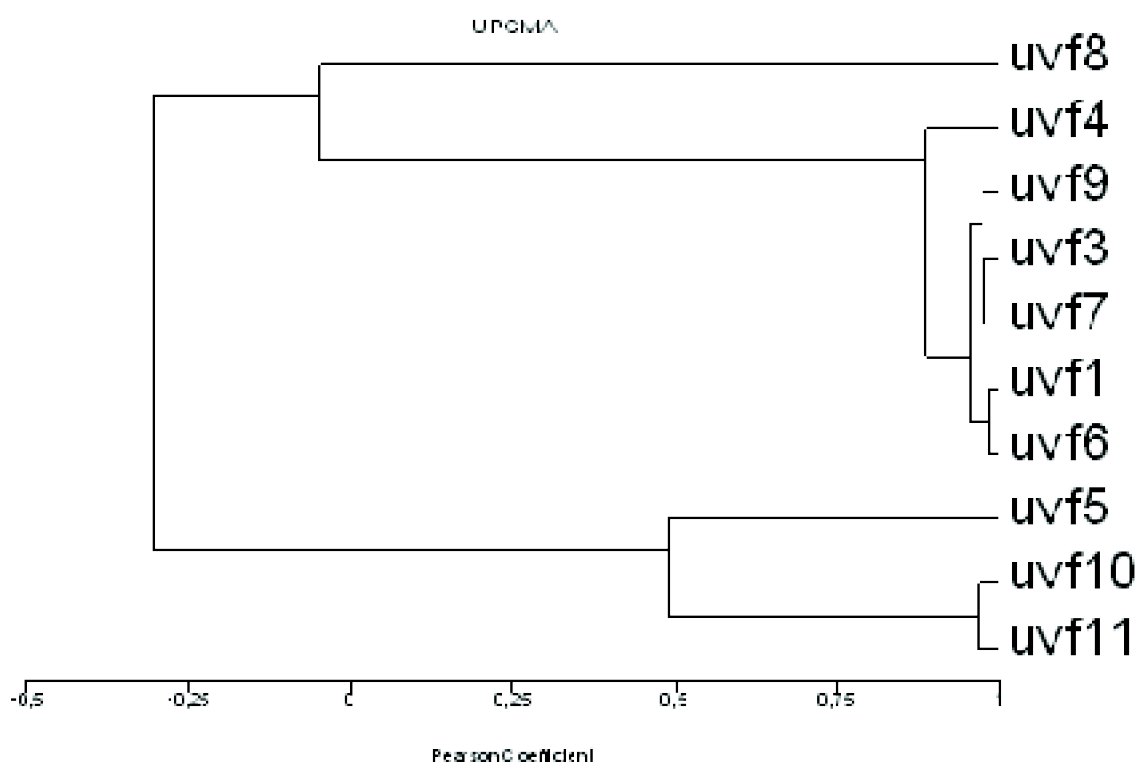


Fig. 18 : Classification hiérarchique des isolats d '*U. viciae-fabae* obtenue par le MVSP (Multi Variate Statistical Package) en utilisant le coefficient de Pearson, selon la méthode UPGMA

III.2.2- Discussion

Aussi bien les isolats que les cultivars, ils ont montré un comportement différentiel. Selon les niveaux de réactions des isolats, les cultivars et les isolats ont été classés chacun dans un ordre différent.

En effet, tous les isolats ont classé 18009S comme cultivar très résistant, tandis qu'une hiérarchisation différentielle est constatée pour les autres cultivars. A titre d'exemple, Mziraa a été classé très résistant successivement à l'égard des isolats UVF10, UVF11, UVF5, et UVF2, alors que ce même cultivar est classé peu résistant à résistant pour les isolats UVF3, UVF4 et UVF7, UVF10.

Si pour le cultivar 18009S aucune variabilité dans la sévérité des attaques par les isolats n'est observée, et que tous ces isolats sont classés dans un groupe unique, en revanche, ces mêmes isolats ont pu être hiérarchisés différemment par les cultivars Mziraa, Seville, Giza 402, et Giza Blanca. Chacun d'eux a pu distinguer au moins deux groupes d'isolats, avec des ordres différents de sévérité d'attaque.

L'existence d'une telle interaction différentielle entre les isolats d' *U. Viciae-fabae* et les cultivars de *Vicia faba*, suggère qu'il existe des races physiologiques de ce pathogène (Vander plank, 1978), hypothèse déjà émise par certains auteurs. Ainsi, Conner et Bernier (1982a) et Meskine (1996) ont rapporté que la variabilité génétique de ce champignon serait liée à l'existence de races physiologiques ; Kispatic, (1944) in Guyot (1957), avait

déjà reconnu l'existence de ces races biologiques. Dans un travail précédant Ait Issad et Aziri, (1999) ont suggéré l'existence de 2 races physiologiques mises en évidence par un test du pouvoir pathogène réalisé sur 3 isolats d'*U viciae-fabae* vis-à-vis de 6 cultivars de fève et de féverole.

D'autres auteurs comme Emeran et *al.*, (2001) ont par ailleurs pu identifier un certain nombre de ces races. En étudiant le comportement de 23 isolats d'*U. viciae-fabae* du pourtour méditerranéen, de Hollande, du Chili et d'Australie vis-à-vis d'une gamme différentielle composée de 7 lignées, ces derniers ont identifié 16 races physiologiques de ce pathogène.

Dans notre cas, les isolats testés seraient donc des races spécifiques différentes les unes des autres par leur virulence et les cultivars différents par leur niveau de résistance verticale ou complète (Rappily, 1991 ; Vander plank, 1968 et Messiaen, 1982). Cette interaction du type gène pour gène est conférée par un nombre réduit de gènes spécifiques qui rendent cette résistance non durable. Peut être est vite contournée par l'apparition d'une nouvelle race, notamment, par voie de sélection, de mutation et/ou par flux génétique (Burdon, 1997 et Rappilly, 1991).

Conner et Bernier, (1982 b) ont pu identifier dans 7 lignées « inbred » de fève, 3 de ces gènes de résistance spécifique à la rouille. Ces gènes d'intérêt ont été reconnus dominants.

Parmi les isolats étudiés, certains ont montré une différence dans le degré d'attaque, sans pour autant qu'il y est une interaction différentielle isolats / cultivars. C'est le cas des isolats UVF10 et UVF11, qui ont montré un niveau quantitatif de la variabilité du pouvoir pathogène. Pour ce dernier type d'interaction, la différence résiderait dans le niveau d'agressivité des isolats et le niveau de résistance horizontale ou partielle des cultivars. Ce type d'interaction a déjà été mis en évidence avec plusieurs gènes exprimés sur des cultivars de fève en conférant un phénotype résistant à cette plante, vis à vis de certaines races spécifiques de rouilles. Beaucoup de ces sources de résistance ont été utilisées pendant longtemps pour qu'ils soient considérés comme gènes de résistance durables (Rashid et Bernier, 1986).

Cette réaction polygénique a été qualifiée par certains auteurs de " slow rusting" (Bond et *al.*, 1994 ; Conner et Bernier, 1982c), un terme désignant une expression lente de la résistance. Il s'agit d'un développement limité de la maladie au champ sur certains cultivars, par rapport à d'autres qui paraîtraient sensibles au stade plantule. A maturité, ces cultivars deviendraient tolérants (Conner et Bernier, 1982c), avec cependant, un niveau de tolérance variant d'une population à une autre (Rashid et Bernier, 1991).

Il a été rapporté que l'analyse génétique de cette résistance polygénique et partielle, a montré qu'elle était contrôlée par une hérédité nucléaire, où interviendraient simultanément l'effet de l'additivité de certains gènes ainsi que celui de la dominance d'autres gènes. Un effet dû à une hérédité cytoplasmique de la résistance a été également rapporté (Stoddard et Herath, 2000).

Par ailleurs, il a été observé que cette résistance incomplète ou partielle s'exprimerait de deux manières, dont l'une agissant sur la sévérité de la maladie sans générer de réaction nécrotique, et l'autre faisant intervenir la réaction d'hypersensibilité. Cette

résistance est caractérisée par une longue période de latence ainsi qu'une taille réduite des pustules produites sur des génotypes résistants (Bhalla et Bernier, 1984). La seule différence entre les deux expressions de la résistance, résiderait dans la présence ou l'absence de réaction nécrotique.

Des manifestations symptomatiques similaires à celles décrites par Bhalla et Bernier, (1984) ont été observées au cours des notations effectuées durant les tests de pathogénicité. Ainsi, une réduction de la taille des pustules et une période de latence relativement longue par rapport aux réactions des autres cultivars, ont été mises en évidence. C'est notamment le cas de certains cultivars tels que Giza 402 et Giza Blanca vis à vis des isolats UVF1, UVF2, UVF5 et UVF6. Ces réactions suggèrent l'existence d'une résistance du type « slow rusting » chez les génotypes testés en conditions algériennes. En effet, ces deux cultivars n'ont exhibé des pustules, qu'après 7 jours de latence, pendant que les autres ont exprimé des pustules sporifères après seulement 5 jours. Les pustules ainsi apparues sont de taille relativement réduite par rapport à celles apparues sur les autres cultivars.

La taille des pustules pourrait être donc un critère très important à considérer dans le criblage génétique des génotypes résistants. Des études menées à l'échelle histologique, ont montré que ce type de résistance n'est pas lié à une réduction de la croissance du mycélium inter-cellular, comme dans le cas des rouilles des céréales. Elle serait plutôt liée au manque d'efficacité des cellules mères haustorines qui, malgré leur formation, seraient non fonctionnelles, d'où le terme de « résistance préhaustorienne » utilisé pour qualifier ce genre de résistance. Ces études ont également révélé une corrélation positive entre la réduction du nombre d'haustoria et la taille des pustules chez les génotypes résistants, indiquant le rôle des haustoria dans la formation des pustules sporifères (Sillero et Rubiales, 2002). Le dépôt de callose au niveau des cellules en voie d'infection serait à l'origine de la réduction dans le nombre des haustoria, aboutissant au phénotype résistant (Rubiales et *al.*, 2001).

Sur la base de la taille des pustules, Conner et Bernier, (1982 b) ont pu identifier deux races physiologiques de ce pathogène et Emeran et *al.*, (2000), ont par ailleurs, pu en décrire 16. En utilisant une échelle de notation basée sur le pourcentage de pustules produites sur feuilles et/ou tiges, nous avons suspecté l'existence d'au moins deux races sur les 11 isolats testés. Cependant, nous n'avons pas pu identifier et caractériser ces races, par absence d'une gamme d'hôtes de référence, dont les gènes de résistance sont préalablement identifiés. Par ailleurs, le choix de l'échelle de notation serait probablement à l'origine du nombre réduit de races suspectées. En effet, si nous avons pris en considération une échelle combinant le pourcentage des pustules et leur taille, la variabilité aurait pu être plus importante

D'après ces données préliminaires, il semble que dans les conditions algériennes, il existerait un haut niveau de résistance horizontale ou incomplète par rapport à celui de la résistance verticale ou spécifique, confirmant ainsi les données obtenues à l'échelle du bassin méditerranéen (Rubiales, 2001 ; Silero et Rubiales, 2002).

III.3 - Etude du polymorphisme par les marqueurs moléculaires

Avant l'étude du polymorphisme génétique par RAPD, et dans une étude préliminaire d'optimisation de l'extraction de l'ADN, 3 protocoles ont été testés. Le protocole SDS, le protocole CTAB et le protocole SDS/CTAB.

III.3.1- Optimisations des extractions

III.3.1.1- Présentation des résultats

Les résultats des extractions d'ADN par les 3 méthodes basées respectivement sur l'utilisation du SDS, du CTAB et du SDS/CTAB sont représentés dans la figure 19. En effet, le protocole basé sur la combinaison SDS/CTAB s'est révélé le plus adéquat ; il a donné les meilleurs résultats sur le plan quantitatif et qualitatif de l'ADN. Les résultats de l'estimation de la quantité et de la qualité d'ADN obtenue par spectrophotométrie, sont présentés dans le tableau 12.

En effet, l'efficacité des méthodes d'extraction s'est révélée variable d'un protocole à un autre (Fig 19 et Tab 12). Ainsi, l'extraction à partir de 20 mg d'urédospores a permis l'obtention de concentrations en ADN par ordre d'efficacité est dans l'ordre comme suit : SDS /CTAB – CTAB – SDS.

L'extraction à partir de 100mg de spores par la méthode SDS/CTAB, a permis d'obtenir une quantité d'ADN variant entre 80 et 100 ng / μ l (Fig. 20 et Tab. 13).

M 1 2 3

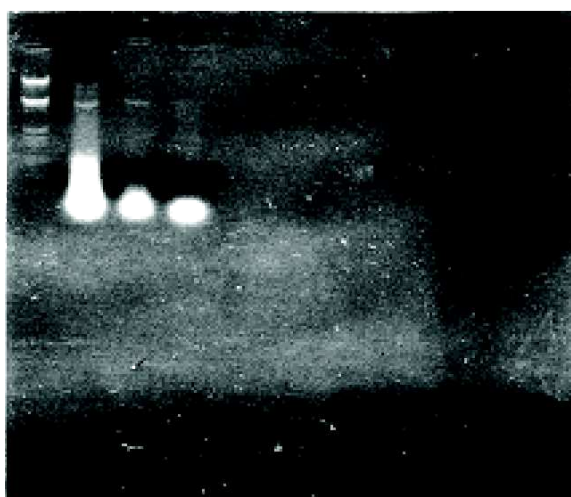


Fig. 19 : Empreintes d'ADN obtenue respectivement par les méthodes SDS / CTAB(1), CTAB (2) et SDS (3) à partir de 20mg d'urédospor

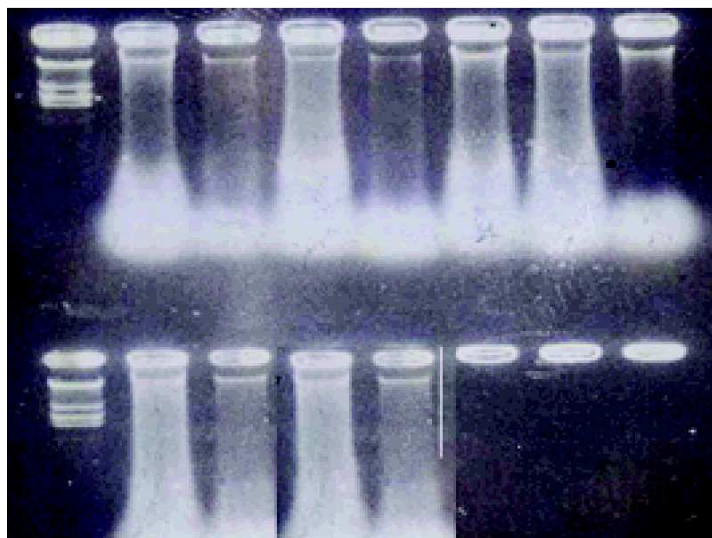


Fig. 20 : Extraits d'ADN, obtenus par le protocole SDS/CTAB, à partir de 100mg d'urédospores

III.3.1.2- Discussion

Les extractions d'ADN, réalisées par les 3 protocoles basées successivement sur l'utilisation du SDS, du CTAB et du SDS / CTAB, n'ont pu être possible qu'en additionnant une étape supplémentaire de broyage des urédospores. Celle-ci a été tentée en présence d'un abrasif (sable), d'azote liquide et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Le broyage des échantillons dans un mortier préalablement stérilisé, en présence d'azote liquide, facilite la lyse des cellules (Do et Adams, 1991). En effet, certaines structures tels les sclérotés et les urédospores, pourvues d'épines très dures leur servant à la fixation sur les feuilles des plantes hôtes (Clement et al 1998, 1994 et Littlefield et al 1979), nécessitent un broyage en présence d'abrasifs comme le sable (Chen et al., 1993). Pour plus d'efficacité, il est préconisé le broyage de telles structures dans une mixture de sable et d'azote liquide (Edwards et al., 1999).

Cette destruction des parois des urédospores a été d'avantage facilitée par l'utilisation du peroxyde d'hydrogène qui a permis à l'ADN d'être à la portée des deux détergents le SDS et le CTAB, utilisés dans les extractions. Le PVP (Poly – vinyl – pyrrolidone) a permis de prévenir l'oxydation de l'ADN par le H₂O₂ (Couch et Fritz, 1990).

La dégradation des membranes et des protéines est réalisée par l'addition du SDS ou du CTAB ou encore du SDS puis du CTAB au tampon de lyse. Selon les protocoles d'extraction utilisés, il s'est révélé une efficacité différentielle. En effet, les protocoles basés sur la méthode SDS sont les plus préconisés pour l'extraction de l'ADN génomique (Yoon et al., 1991). Ces derniers exploitent la caractéristique de dénaturation des liaisons de covalence. C'est ainsi que sous conditions alcalines, l'ADN est dénaturé puis il reprend son état initial dans une solution contenant du SDS et un sel d'Acétate. Le sel d'Acétate neutralise les paires de base en les agrégeant, les rendant ainsi insolubles et par la

même, il y a séparation de l'ADN des protéines ; ce qui permet de précipiter ces protéines par une centrifugation (Anonyme, 1996). Le SDS a également un effet inhibiteur de l'activité enzymatique de l' endonucléase (Weigan et Baum, 1993).

D'après Doyle et Doyle (1987), les protocoles CTAB ont donné de meilleurs résultats pour les champignons (Weising et *al.*, 1991 a, b), malgré que les protocoles basés sur l'utilisation du SDS aient révélé une bonne efficacité pour ces organismes (Yoon et *al.*, 1991).

En effet, le CTAB qui est un détergent cationique, permet de solubiliser les membranes et par conséquent peut former avec l'ADN un complexe, qui précipite par une centrifugation légère (Weising et *al.*, 1991 b). Cependant ce produit n'inhibe pas l'activité des endonucléases et l'effet de ces enzymes peut être prévenu en respectant la chaîne de froid, et en utilisant l'EDTA qui a la propriété de chélater l'ion magnésium indispensable à leur activité.

Dans les protocoles SDS, la séparation de l' ADN des autres composés, se fait par centrifugation ; l'ADN est alors concentré par précipitation à l'éthanol (Anonyme 1996). Par contre, les méthodes basées sur l'utilisation du CTAB, nécessitent une extraction de l'ADN complexé par le CTAB, avec un solvant organique non miscible (chloroforme/ alcool iso- amylique 24 :1) et dans lequel l'ADN sera dissous (phase aqueuse supérieure). Les lipides sont éliminés et les protéines sont coagulées dans le solvant pour former une galette à l'interphase (Anonyme, 1999). Après transfert de la phase aqueuse supérieure dans laquelle l'ADN est dissous, ce dernier est précipité en ajoutant à volume égal de l'isopropanol froid (Weising et *Al.*, 1991 a et b). L'extraction par le complexe chloroforme-alcool iso-amylique ainsi que la précipitation à l'iso propanier froid expliquent probablement le rendement appréciable en ADN dans les protocoles du CTAB. Ces protocoles utilisant un complexe CTAB1% / Na Cl 0.7 M permettent également l'élimination des polysaccharides (Do et Adams, 1991).

L'utilisation d'un détergent à base du SDS - CTAB a donc permis d'avoir une meilleure efficacité en matière de quantité d'ADN extraite.

En revanche la qualité d'ADN est moindre pour les 3 protocoles d'extraction, avec une légère différence variant du moins mauvais (SDS/ CTAB) au plus mauvais protocole (SDS), en passant par une qualité intermédiaire (CTAB) Tabl. 12. En effet, les valeurs relatives au ratio DO 260 /DO 280 sont très loin de la référence de bonne qualité d'ADN rapportée entre 1.8 et 2. Une telle qualité est liée à la présence de contaminations de la suspension d'ADN, par des substances, telles les protéines, les phénols (Sambrook et *al.*, 1989) et les polysaccharides (Fang et *al.*, 1992 ; Sambrook et *al.*, 1989 et Murray et thompson, 1980). Ces polysaccharides rendent la préparation d'ADN très visqueuse et inhibent l'activité des enzymes (Do et Adams, 1991) ; Avec les phénols, ces derniers peuvent donc détériorer la qualité de l'ADN et /ou inhiber les enzymes telles les endonucléases de restriction et les polymérase (Weising et Kahl, 1998). Ce qui signifie, une amélioration de cet aspect qualitatif pour les 3 protocoles. L'utilisation ultérieure de l'ADN, nécessite donc une étape supplémentaire de purification (Edward et *al.*, 1996 ; Frang et *al.*, 1992 ; Sambrook et *al.*, 1989 et Murray et Tompson, 1980).

Cette qualité supérieure de l'ADN est nécessaire pour les méthodes d'analyse de

l'ADN basées notamment sur l'utilisation d'enzymes de restriction (Vos et kuiper 1998 ; Yoong et al 1991). Elle n'est cependant pas très nécessaire pour les méthodes d'analyses basées sur l'amplification enzymatique (Rafalski, 1998).

III.3.2- Etude du polymorphisme génétique par RAPD

III.3.2.1- présentation des résultats

De toutes les amorces utilisées dans l'étude du polymorphisme génétique par RAPD, seules les amorces OPB1, 2, 7, 10,15, 18, OPA 17, OPAE7 et OPAE10, ont pu générer des bandes polymorphes d'ADN sur gels d'électrophorèse (Fig. 21, 22, 24 et 26). Cependant, les profils relatifs à l'amplification par les amorces de la famille des OPB n'ont pu révéler de polymorphisme génétique (Fig. 21), alors que les OPA et OPAE ont mis en évidence un polymorphisme, avec des niveaux de variabilité allant du moins variable (OPAE10) (Fig. 22) au plus polymorphe (OPA 17)(Fig. 26), passant par un polymorphisme intermédiaire (OPAE7)(Fig. 24)

Les amorces de la famille des OPB ont révélé 198 bandes, toutes non polymorphes, alors que, les amorces OPAE 10 et OPAE7 ont produit respectivement 20 et 30 bandes, dont 3 polymorphes pour OPAE10 et 5 polymorphes pour OPAE7. Par ailleurs, l'amorce OPA17 a pu amplifier un nombre important de bandes (55), comparé aux précédentes amorces, avec un polymorphismes plus important (7 baes polymorphiques), soit 15.75 % de bandes polymorphes (Tabl. 14)

Mar uvf1 uvf2 uvf3 uvf4 uvf5 uvf6 uvf7 uvf8 uvf9 uvf10 uvf11 Mar

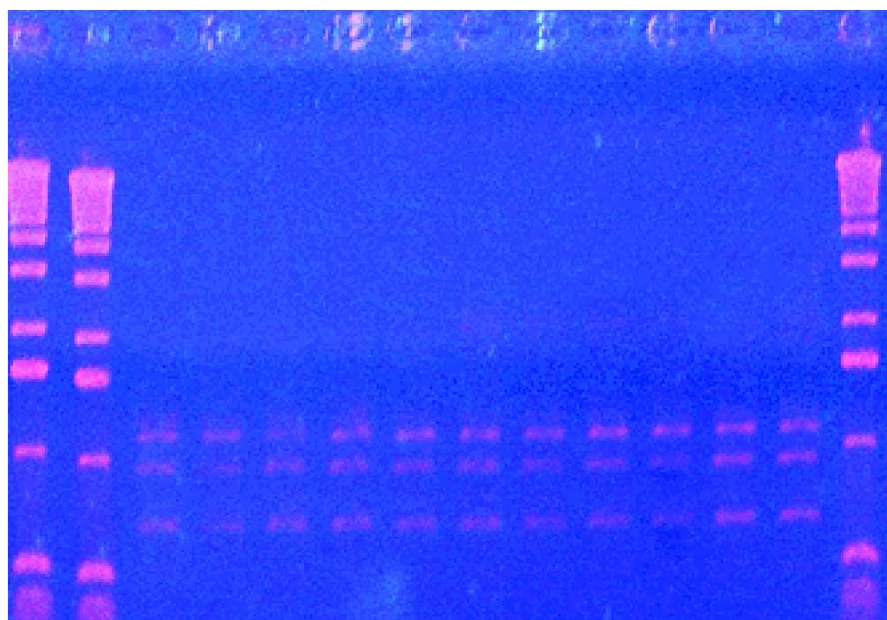


Fig. 21 : Profils monomorphe obtenus respectivement avec les amorces OPB1,OPB2, OPB7, OPB10, OPB15, OPB18

Mar UVF1 UVF2 UVF3 UVF4 UVF5 UVF6 UVF7 UVF11 UVF9 UVF10 UVF8 Mar

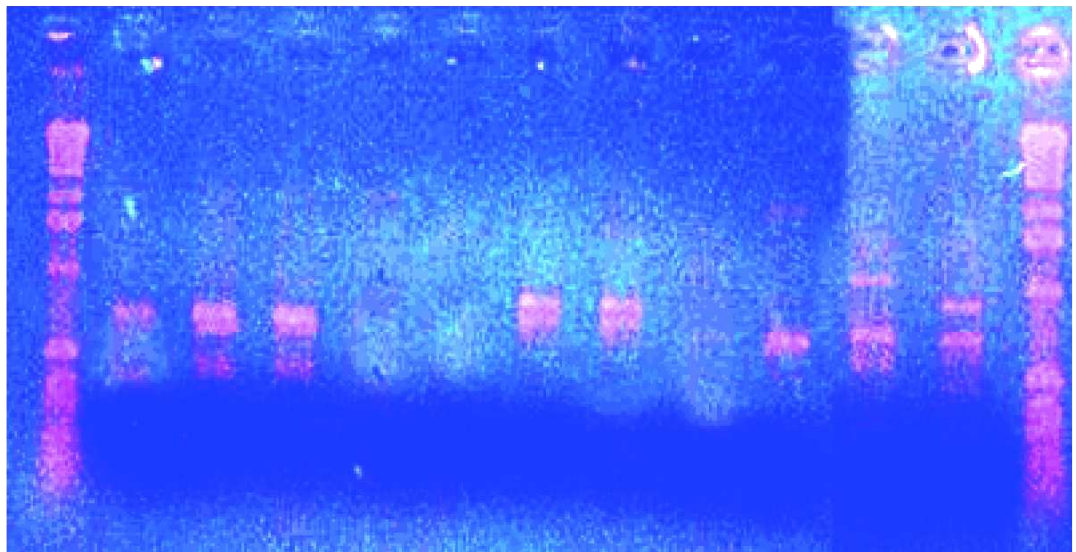


Fig. 22 : Profil polymorphe obtenu par l'amorce OPAE10

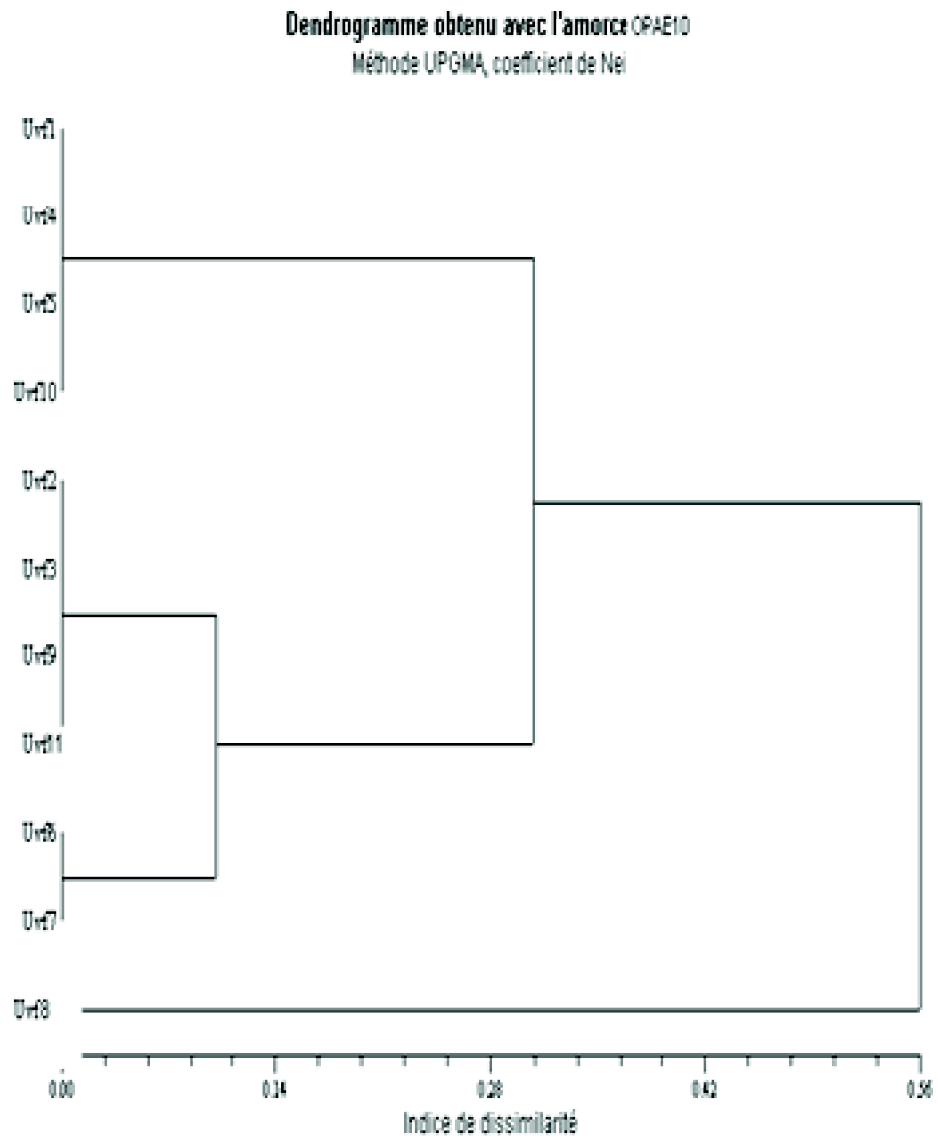


Fig. 23 : Dendrogramme obtenu pour L'amorce OPAE10 ; analyse de 11 isolats d'*U.viciae-fabaeen* utilisant le progamme UPGMA (Unweighted pair groupe arithmetic mean) de NTSYST.

Mar UVF1 UVF2 UVF3 UVF4 UVF5 UVF6 UVF7 UVF8 UVF9 UVF10 UVF11 Mar

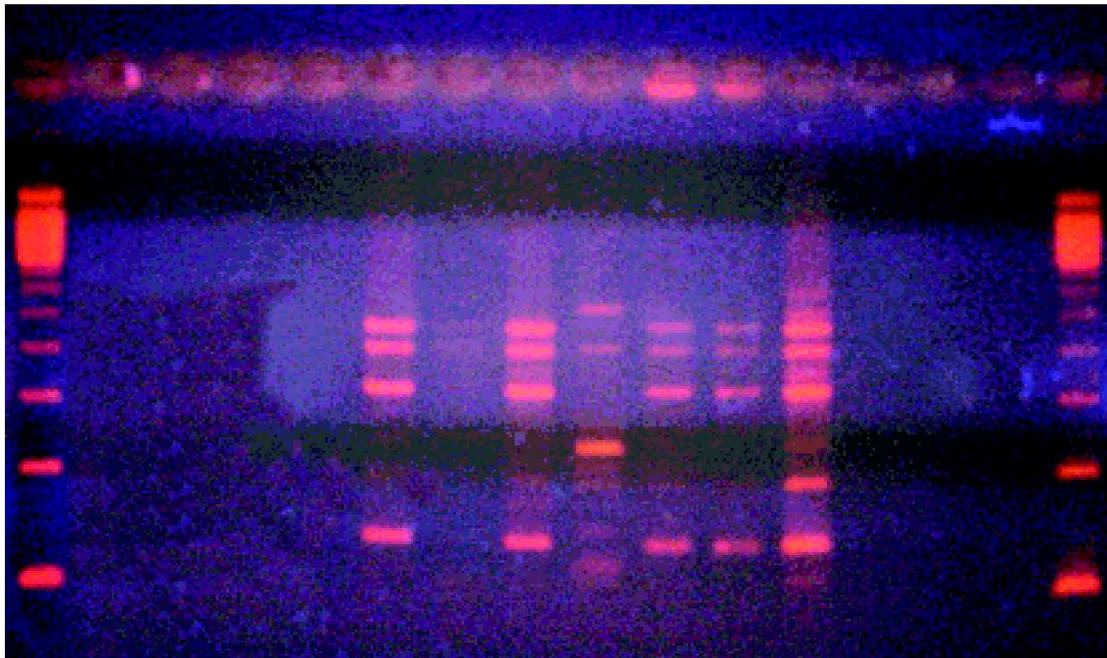


Fig. 24 : Profil polymorphe obtenu avec l'amorce OPAE 7

Dendrogramme obtenu avec l'amorce OPAE7
Méthode UPGMA, coefficient de Nei

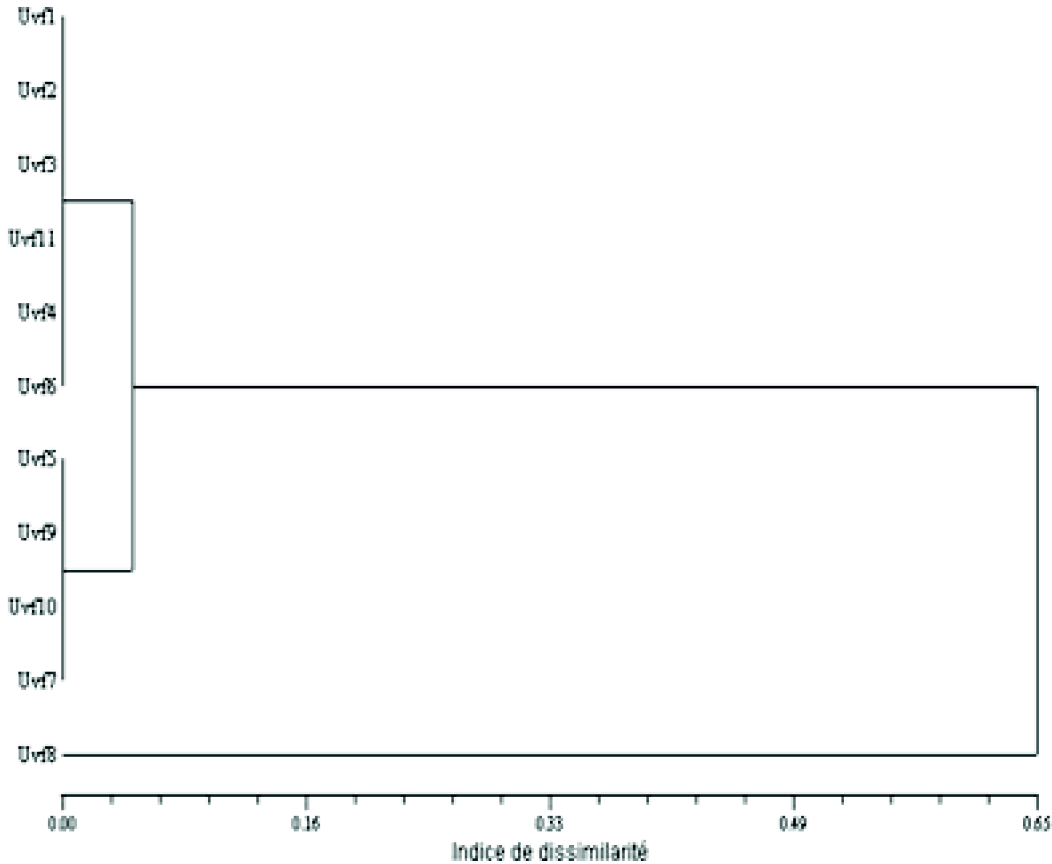


Fig. 25 : Dendrogramme obtenu pour l'amorce OPAE7 ; analyse de 11 isolats d'*U.vicae-fabae*en utilisant le progamme UPGMA (Unweighted pair groupe arithmetic mean) de NTSYST.

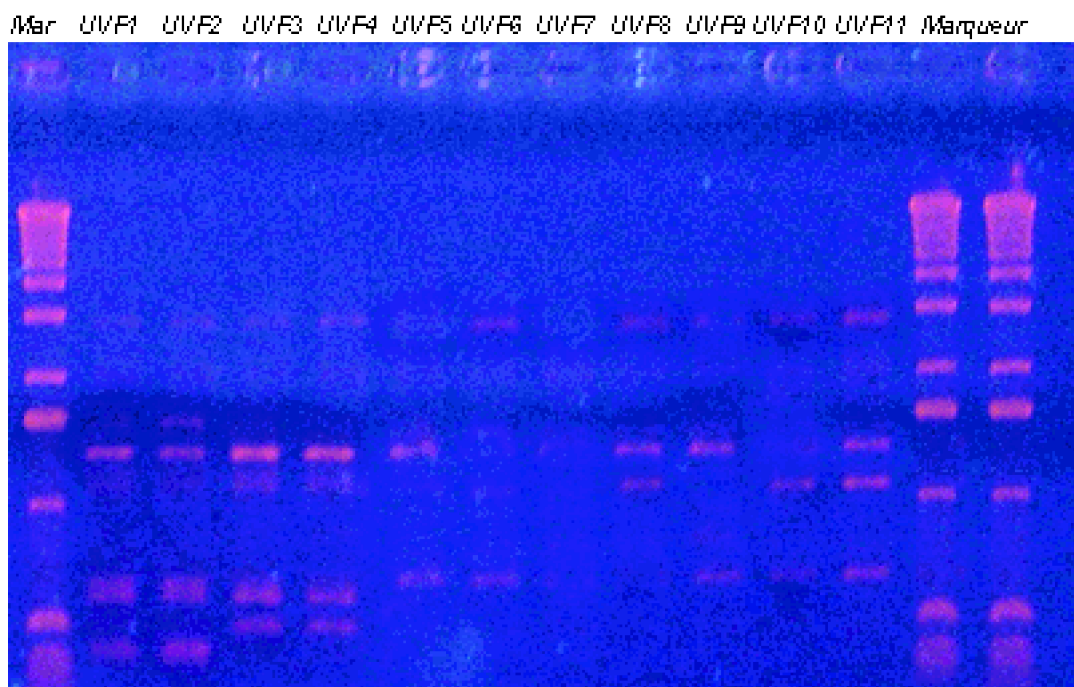


Fig. 26: Profil polymorphe obtenu avec l'amorce OPA17

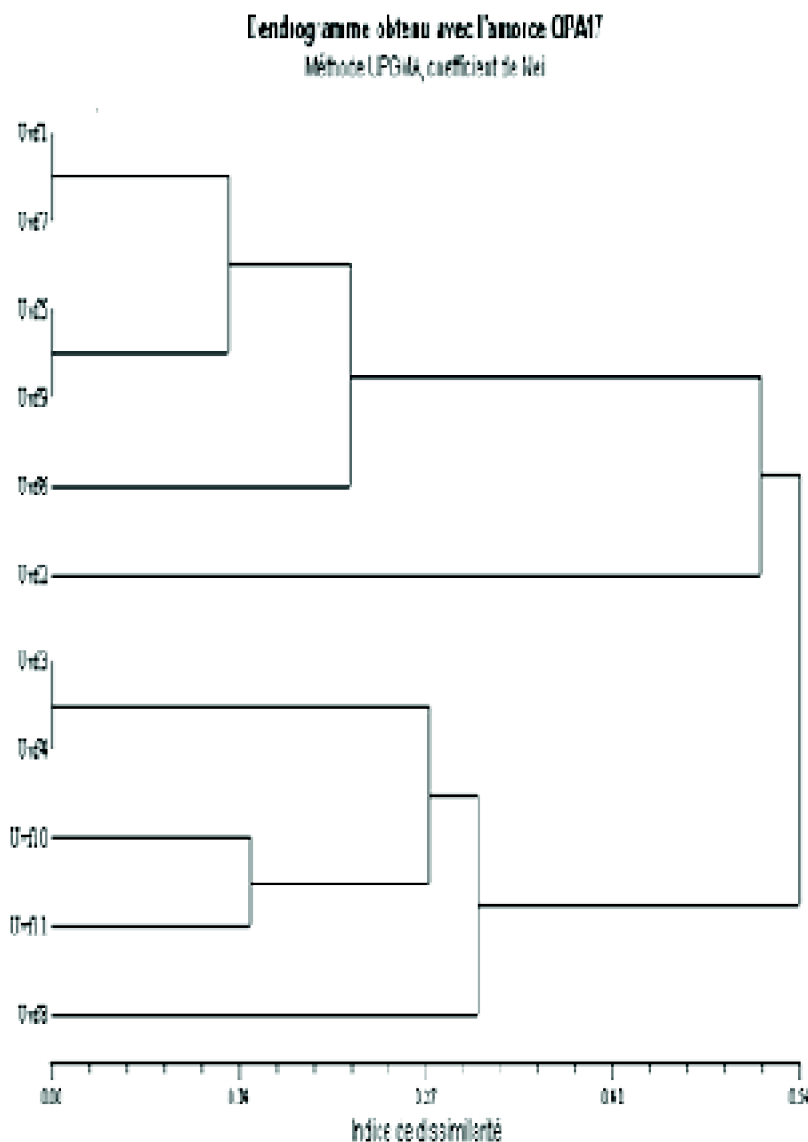


Fig. 27 : Dendrogramme obtenu pour l'amorce OPA17 ; analyse de 11 isolats d'*U. viciae-fabae* en utilisant le programme UPGMA (Unweighted pair group arithmetic mean) de NTSYST.

L'analyse statistique des profils polymorphes obtenus par les amorces OPA17, OPAE10 et OPAE7, a donné les résultats représentés par les dendrogrammes des figures 23, 25 et 27.

En effet, un seuil de coupure à 50% de similitude permet d'obtenir au moins deux groupes se rapprochant des groupes réunis par le test de pathogénicité. A ce seuil de coupure, les amorces OPAE7 et OPAE10 font ressortir deux groupes distincts, dont l'un est constitué par l'isolat UVF8 et l'autre par les isolats restants (Fig. 23 et 25). En revanche, à ce même seuil de coupure, l'amorce OPA17 a pu montrer un niveau de variabilité plus important, montrant 3 groupe. Par contre, à un seuil de 70% de similitude OPA17 a permis de présenter quatre groupes distincts, dont deux déjà identifiées par les précédentes amorces et deux autres nouvellement décelés par OPA17. A ce seuil de coupure l'isolat UVF8 s'est distingué en formant un groupe à part. De bas en haut les

groupes ainsi identifiés sont (Fig. 27).

- Groupe 1 : UVF8
- Groupe 2 (avec deux sous groupes) : UVF11 et UVF10, formant le premier sous groupe ; UVF4 et UVF3, formant le deuxième sous groupe
- Groupe 3 : UVF2
- Groupe 4 (avec deux sous groupes) : UVF6, formant le premier sous groupe ; UVF9, UVF5, UVFÈ, et UVF9, formant le deuxième sous groupe.

Nous remarquons que: OPA17 a regroupé UVF10 et UVF11 dans un même sous groupe, se rapprochant ainsi des données obtenues par le test du pouvoir pathogène. En effet, les isolats UVF 10 et UVF11 ont été regroupés dans par le test MVSP dans un même sous groupe (Fig. 18).. Egalement l'analyse des moyennes, obtenue par le test de Newman et Keuls a montré un net rapprochement entre ces 2 isolats (moyenne UVF10 = 3,12 et Moyenne UVF11 = 3,20), par rapport au reste des isolats de se groupes, dont la moyenne était autour de 2 (Tabl.17, annexe 2)

III.3.2.2- Discussion

La rouille de la fève est causée par un champignon dit parasite obligatoire ou biotrophe, dont la culture *in vitro* est souvent impossible. En effet, ce genre de champignons nécessitent pour sa croissance et son développement, une multiplication sur leurs plantes hôtes. Ce qui rend difficile la collecte de grandes quantités de matériels fongiques, servant à l'extraction de l'ADN, d'où la nécessité de recourir à la RAPD qui a toutefois la possibilité d'analyser d'infimes quantités d'ADN (de l'ordre du nanogramme) (Burdon 1993 ; Chen et al 1993). Cette multiplication du matériel biologique sur hôte naturel, n'exclut cependant pas le risque de contamination par de l'ADN polluant. Cette contamination de l'ADN cible, serait à l'origine d'erreurs d'analyse génétique, par amplification de l'ADN qui contamine les extractions (Anonyme .,1999 et 1996).

La principale limite de la RAPD réside dans l'analyse du matériel génétique d'organismes diploïdes. En effet, dans le cas d'hérédité mendélienne, comme par exemple dans le cas des relations hôte - pathogène monogéniques, son utilisation reste quelque peu inadéquate. L'ADN étant amplifié à partir de l'un ou de l'autre des deux brins. Ce qui rend difficile voire, impossible de distinguer les loci homozygotes des loci hétérozygotes au niveau des fragments amplifiés (Williams et al.,1990). Ce qui a permis de qualifier ses marqueurs de co-dominant. Les résultats de cette technique se sont également avérés non reproductibilité, limitant ainsi son utilisation au criblage moléculaire de la diversité génétique (Burdon, 1993). Ce ci ne présente cependant pas de problèmes pour les organismes hétérothalliques tels que les rouilles, dont les descendants sont obligatoirement hétérozygotes.

En dépit des limites rapportées à cette technique, celle-ci a donné satisfaction dans l'étude de la diversité génétique des populations de rouilles et autres parasites obligatoires (Pei et al .,1997 ; Chen et al .,1993 ; Macclean et al .,1995).

Dans notre cas, la RAPD a révélé un polymorphisme génétique relativement faible,

détecté notamment, par les amorces OPAE7 et OPAE10 et qui semblent bien s'adapter à ce groupe de pathogène. Plus encore, l'amorce OPA17 a pu mettre en évidence un polymorphisme relativement important, comparé aux précédentes amorces. Cette dernière amorce a été rapportée très sélective, notamment pour la caractérisation moléculaire du genre *Uromyces ssp* (Macclean., 1995). Néanmoins, ce faible polymorphisme estimé par le pourcentage de bandes polymorphes (15.57% de bandes polymorphes) est probablement dû à la taille réduite des échantillons testés, ainsi qu'à l'origine géographique très proche des isolats

Les amorces OPK 16, OPC8, OPC10, OPC13 et OPE15, n'ont donné aucune amplification, en raison de leur inadaptation à l'amplification de l'ADN provenant des champignons du groupe des rouilles, notamment du genre *Uromyces ssp*. En effet, dans des études comparables de polymorphisme génétique, aucune de ces amorces n'a été préalablement testée pour la diversité des populations de ce genre. En revanche, les amorces des familles OPI, OPF et OPH et surtout celles de la famille OPA se sont montrées très polymorphes dans la distinction des races d'*Uromyces appendiculatus* (Maclean., 1995). Certaines amorces des familles OPC et OPE ont pu distinguer les races physiologiques de *Puccinia striformis* (Chen et al., 1993). Ces mêmes amorces ont révélé également un important polymorphisme chez le genre *Phoma* (Bouznad et al.,1995).

Dans notre étude, les amorces de la famille OPB ont révélé des profils monomorphes, à l'exception de l'amorce OPB20, pour laquelle nous n'avons obtenu aucune amplification. Ces dernières ont été rapportées très sélectives pour l'étude du polymorphisme génétique du genre *Botrytis* (Salhi, 2005).

L'analyse des dendrogrammes obtenus à partir des profils générés par l'amorce OPA17, montre que l'isolat UVF8, semble être génétiquement proches des autres isolats, notamment des isolats UVF 10 et UVF 11, puisque UVF8 n'a pu être séparé qu'à un seuil de coupure de 70% de similitude (fig. 17). En revanche, les amorces OPAE7 et OPAE10 ont pu séparer l'isolat UVF8 des autres au seuil de coupure de 50% de similitude (Fig. 13 et 14). Ce qui suggérerait l'existence d'une différence génétique significative entre cet isolat et les autres. Les amorces OPAE7, OPAE10 et OPA17 ont de ce fait pu distinguer l'isolat UVF8 des autres isolats. En effet, UVF8 est le seul isolat en provenance de Tunisie, alors que le reste des isolats provient de l'Algérie ; ces 3 amorces ont pu ainsi distinguer des groupes selon l'origine géographique des isolats.

La variabilité génétique ainsi mise en évidence, peut être expliquée par les phénomènes qui ont trait à la diversité génétique des populations dans les patho-systèmes naturels (Burdon 1997) ou cultivés (Chin et Wolf., 1984).

La variabilité génétique chez les populations phytopathogènes et notamment les rouilles, serait principalement acquise par les recombinaisons méiotiques. En effet, un certain nombre de travaux menés sur les rouilles des céréales, ont mis en évidence le rôle de ces recombinaisons dans la variabilité des populations de ce groupe de pathogènes (Kolmer .,1997 et saviile., 1990). Cette variabilité pourrait également s'acquérir par les mutations qui s'expriment généralement par la perte de la fonction avirulence en faveur de la fonction virulence (Bandel et al., 1997).

La sélection naturelle qui s'opère dans les populations hôtes aurait également une

incidence sur la variabilité génétique des populations pathogènes (Kolmer, 1997). Chen et *al.*, (1993), ont rapporté que cette dernière avait un rôle prépondérant dans la variabilité génétique d'*Uromyces appendiculatus*.

De la même façon, la migration ou flux de gènes pourrait être, à un degré moindre, à l'origine d'incorporation de nouveaux gènes notamment, dans les populations de pathogènes se disséminant par voie éolienne, comme c'est le cas des rouilles (Sache., 1995, 1994 et Rapilly, 1991).

L'analyse des dendrogrammes a par ailleurs révélé que ces trois amorces ont permis d'obtenir les mêmes groupes que ceux qui sont obtenus par le test du pouvoir pathogène, analysé par le test de New Man et Keuls et le test de classification hiérarchique par MVSP. Il est mis en évidence cependant relativement plus de diversité génétique par l'amorce OPA17. Cette même amorce nous a permis de retrouver le sous-groupe comportant les isolats UVF10 et UVF11, déjà identifiés par l'analyse des moyennes du test de New Man et Keuls ainsi que par le test MVSP. Ce sous groupe a été identifié par ce dernier test à un seuil de coupure proche de 50% de similitude. Ces deux isolats proviennent de la région Est du pays.

Cette tentative de comparaison entre le test du pouvoir pathogène et l'analyse par RAPD reste très hypothétique et à confirmer par un plus grand nombre d'isolats quant à l'existence d'une quelconque corrélation entre ces deux derniers, puisqu' aucun de ces deux tests ne peut servir de référence à l'autre. En effet, cette corrélation se confirmerait dans le cas où le test du pouvoir pathogène aurait été réalisé avec une gamme d'hôte référentielle standardisée, dont les gènes de résistance régissant l'interaction hôte-pathogène sont préalablement connus et déterminés.

Par ailleurs, certains auteurs ont essayé d'associer les marqueurs moléculaires aux marqueurs de virulence pour mettre en évidence une quelconque corrélation. A cet effet, trois niveaux de corrélation ont été identifiés à savoir, une parfaite corrélation, une corrélation partielle et une absence totale de corrélation (Leung et *al.*, 1993). Dans notre cas, nous avons pu trouver un niveau de corrélation partielle, puisque le marquage par RAPD et le test de pathogénéicité, ont permis une séparation par rapport à l'origine géographique, notamment pour l'isolat UVF8 (Fig. 22, 24 et 26). Tandis que, pour les autres isolats, la séparation a été moins évidente d'une amorce à une autre comparativement au test de pathogénéicité (Fig. 23, 25 et 27). Comme dans le cas général des rouilles, le faible niveau de corrélation entre les marqueurs RAPD et les marqueurs de pathogénéicité, indique que le polymorphisme de l'ADN serait indépendant du pouvoir pathogène et que la sélection, en particulier pour la virulence, jouerait un rôle majeur dans la détermination de la structure génétique de la population pathogène (Chen et *al.*, 1993).

Conclusion

Conclusion générale

Cette étude s'inscrivait dans un travail à long terme portant sur l'appréciation de la diversité génétique de la rouille des fèves, causée par *U. viace-fabae*. L'approche était de déceler d'éventuelles variations entre 11 isolats de ce pathogène, en utilisant à la fois, des marqueurs morphologiques et culturaux, des marqueurs de pathogénicité et des marqueurs moléculaires. Les marqueurs biochimiques n'ont pas été retenus délibérément, en raison du fait que ces pathogènes biotrophes ne montrent fréquemment pas ou peu de variabilité concernant les iso-enzymes ou allo-enzymes (Stoddard et al 1998).

Ainsi, les marqueurs morphologiques et culturaux étudiés, à savoir, la mensuration des urédospores et l'étude de leur pouvoir germinatif et de leur capacité à infecter la plante hôte après différentes durées de conservations, n'ont révélé aucune différence assez significative. En effet, le test de parallélisme n'a nullement détecté de différences significatives pour la mensuration des urédospores. L'étude du pouvoir germinatif et infectieux des spores à travers le test de l'analyse de la variance n'a également pas mis en évidence l'existence d'une différence significative. Pour ces pathogènes biotrophes, ce type de marqueurs paraît donc inadapté, puisque ces derniers ne montrent nullement ou rarement de variabilité à l'échelle macroscopique ou microscopique, bien qu'ils soient génétiquement très diversifiés (Ait Issad et Aziri 1999 ; Wagner et al 1999 ; Guyot 1957). En particulier, le dispositif de lavage des urédospores a été conçu en usant d'un appareil à perfusion ; ce dernier a été adapté pour convenir aux lavages au laboratoire des

urédospores. À l'issue du test du pouvoir germinatif et infectieux, nous avons pu apprécier la durée de viabilité et du pouvoir infectieux des urédospores d' *U. viciae-fabae* ; cette durée serait d'environ quatre mois. Dépassant cette période en conservation dans les conditions sus expérimentées, il serait nécessaire de reconstituer la collection d'isolats.

Les marqueurs de pathogénicité ont, quant à eux, révélé un certain niveau de variabilité, estimé par le test du pouvoir pathogène au moyen d'une analyse de la variance et d'un test de classification hiérarchique. A cet effet, au moins, deux groupes d'isolats se sont distingués en se comportant comme des pathotypes. Cependant, ils n'ont pu être identifiés comme races physiologiques par absence d'une gamme de référence, dont les gènes de résistance seraient connus et répertoriés. Toutefois, un tri a pu être effectué en fonction de l'origine géographique, puisque UVF8, le seul isolat en provenance de l'étranger, en l'occurrence de Tunisie, s'est retrouvé dans un groupe à part.

Un certain niveau de résistance horizontale a été détecté dans les conditions algériennes, de par la réaction des six cultivars testés, comparativement aux résultats obtenus à l'échelle méditerranéenne (Rashid et Bernier 1986 ; Conner et Bernier 1982 c). Il a été rapporté que cette résistance incomplète ou partielle s'exprimait de deux manières, dont l'une agissant sur la sévérité de la maladie sans générer de réaction nécrotique et l'autre faisant intervenir la réaction d'hypersensibilité (Bhalla et Bernier 1984). Des manifestations symptomatiques similaires à ces dernières ont été observées au cours des notations effectuées lors du test de pathogénicité, suggérant ainsi, la possibilité d'existence d'une telle résistance dans les géotypes testés en conditions algériennes.

Parmi les objectifs recherchés de cette étude, figure l'analyse génétique des isolats de d'*U.viciae-fabae*, par les marqueurs RAPD. Cependant il était en tout premier lieu, nécessaire de mettre au point un protocole d'extraction d'ADN, adaptable aux conditions de notre laboratoire. A cet effet, trois protocoles ont été expérimentés pour aboutir au plus efficace, à savoir, le protocole combinant le SDS avec le CTAB. La mise au point de ces 3 protocoles a été obtenue par l'utilisation conjointe d'un broyage des urédospores en présence d'un abrasif, d'azote liquide (Edwards et al 1999) et de quelque micro litres de peroxyde d'hydrogène. Ce dernier a été neutralisé par l'adjonction de PVP à 2%.

Les marqueurs RAPD ont pu pour leur part confirmer cette diversité génétique, dont l'existence avait déjà fait l'objet d'hypothèses préalables (Meskine 1996 ; Conner et Bernier 1982a). En effet, l'analyse des dendrogrammes a révélé que les marqueurs RAPD ont pu, par le biais des amorces OPAE7, OPAE10 et OPA 17, déceler un polymorphisme relativement faible, en raison de la taille réduite des échantillons testés, et de l'origine géographique très proche de ces isolats . Ces amorces semblent bien s'adapter à l'analyse génétique d' *U.viciae-fabae*. Le seuil de coupure de 70% appliqué à l'amorce OPA17, indique cependant que l'isolat UVF8 et les autres isolats sont génétiquement proches. Par contre, pour les amorces OPAE7 et OPAE10, l'isolat UVF8 s'est nettement distingué à un seuil de 50% de similitude.

Pour ces trois amorces polymorphes, nous avons également pu nous rapprocher des résultats obtenus par le test du pouvoir pathogène, avec une diversité plus importante

obtenue avec l'amorce OPA17. La tentative de comparaison entre le test du pouvoir pathogène et l'analyse par RAPD a montré un niveau faible de corrélation, caractérisé par une corrélation partielle et mise en évidence par ces deux tests, en distinguant UVF8 des autres isolats. Cette tentative de comparaison n'est cependant pas suffisamment fondée pour pouvoir réaliser une corrélation entre ces deux tests, puisqu'aucun de ces tests ne peut servir de référence à l'autre. Cette corrélation aurait, par ailleurs, eu un sens dans le cas où le test du pouvoir pathogène aurait été réalisé avec une gamme d'hôtes référentielle, dont les gènes de résistance régissant l'interaction hôte-pathogène sont préalablement connus et déterminés.

Perspectives d'études

Pas mal d'objectifs ont été atteints, cependant il reste quelques ambiguïtés à éclaircir, notamment pour ce qui est de la variabilité du pouvoir pathogène et de la spécialisation parasitaire.

En perspective, nous pensons donc approfondir ces investigations avec un nombre d'isolats plus importants et d'origine géographique plus diversifiée, afin de confirmer ou d'infirmer sur cette hypothèse de diversité, et par la même, d'identifier des marqueurs de races spécifiques après les avoir répertoriés. Par ailleurs, cela permettra de mettre en évidence les formes spéciales de ce pathogène dont l'existence fait l'objet de données controversées. Pour ce faire, des méthodes de marquage moléculaire telles que l'AFLP et la SSR seraient d'un apport appréciable. Ces dernières pourraient éventuellement mettre en évidence une différence à l'échelle génétique. Ainsi, on reconnaîtra ou on réfutera cette notion de formes spéciale, confirmée par certains (Ficher 1902 ; Jordi 1904 ; Hiratsuka 1933 in Guyot 1957) et non admise par d'autres (Conner et Bernier 1982, a ; Meskine 1996).

Un travail tout aussi intéressant ne peut être justifié sans la finalité d'identifier les gènes qui interviennent dans l'interaction hôte - pathogène, dans un but fondamental et pratique en même temps. L'approche fondamentale permettra ainsi de mieux comprendre cette relation hôte - pathogène pour ces organismes biotrophes et l'approche appliquée aura le mérite de mettre en pratique ces données en prévision d'une lutte s'appuyant sur la connaissance de cette relation et des systèmes mono et/ou polygéniques qui la gèrent.

Références bibliographiques

- Ait Issad K. & Aziri H. (1999)** Essai d'une inoculation artificielle d' *U.vicae-fabae*, agent causal de la rouille de la fève. Etude de son pouvoir pathogène et de sa spécialisation parasitaire. Mémoire d'ingénieur d'état en agronomie INA El Harrach, pp 70
- Akkaya, M.S., Shoemark, R.C., Spech, J.E., Bhagwat, A.A., & Cregan, P.B. (1995).** *Crop science*. **35** : 1439-1445
- Allen P.J., Strange R;N & Elnaghy M.A. (1971)** Properties of germination inhibitor from stem rust uredospores . *Phytopathology*. **61**: 1382-1389.
- Anonyme (1999).** Roche Molecular Bio chemicals. PCR application manual 2end edition. Ed. Roche diagnostics GmbH, Mannheim.
- Anonyme (1996a).** DNA purification.In:Protocols and applications guide. Third edition. Ed by Promega corporation. pp75 – 90.
- Anonyme (1996b).** Nucleic acid amplification.In:Protocols and applications guide. Third edition. Ed by Promega corporation. pp192-206.
- Arthur J.C.(1934)** Manual of the rusts in United States and Canada. Purdue Research Foundation, Lafayette, Indiana
- Bernier C., Hanounik S.B., Hussein M.M., & Mohamed H.H.(1984)** Field manual of common faba bean diseases in the Nile valley. Information Bulletin N° 3. International Centre for Agricultural Research in Dry Area (ICARDA).

- Bhalla . M.K., & Bernier . C.C (1984)** Evaluation of the component of rate-reducing resistance in *Vicia faba* to *Uromyces viciae- fabae* . *Phytopathology* **74**: 819.
- Bond D.A .,Jellis G.J., Rowland G.G., Le Guen J., Robertson L.D ., Khalil S.A. , & Li-Juan L. (1994)** Present statut and future strategy in breeding faba bean for resistance to biotic and abiotic stress. *Euphytica* **73**: 151-166.
- Bouznad, Z., Corbiere, R., El Biari, H., & Spire, D. (1995).** Identification of *Ascochyta* species of legumes by Random Amplified Polymorphic DNA. 2nd European conference on grain legumes Copenhagen p 78
- Bouznad Z. Maatoughi M .E.H. & Labdi M. (1996)** Importance et distribution géographique des maladies fongiques des légumineuses alimentaires. In :Ezzahiri et al. Ed :Proceeding du symposium régionale sur les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires, 11-14 novembre, 1996, Rabat, Maroc pp : 13-19
- B randel U.E., Haemmerli U.A., MacDermott J.M & WolfM.SchilversG.A. (1997)** Interpreting genetic data with the help of genetic linkage maps. In: gene-for-gene relationship in plant parasite interactions Ed by Crute. I R., Holub.E.B. & Burdon J.J. CAB International. p 157
- Brown J.K.M., Foster E.M & Ohara R.B. (1997)** Adaptation of powdery mildew population to cereal varieties, in relation to durable and non durable resistance. In: gene-for-gene relationship in plant parasite interactions. Ed by Crute. I R., Holub.E.B. & Burdon J.J. CAB International. p 119
- Burdon , J.J. (1997).** The evolution of gene for gene interactions in natural pathosystem. In: gene-for-gene relationship in plant parasite interactions. Ed by Crute. I R., Holub.E.B. & Burdon J.J. CAB International. p245
- Burdon J.J. (1993).** The stucuture of pathogène populations in natural plant communities. *Ann. Rev. Phytopathol.* **31**: 305-323.
- Burdon J.J., & Roelfs A .P.(1985)** The effect of sexual and asexual reproduction on the isosyme structure of population of *Puccinia graminis*. *Phytopathology.* **75**: 1068-1073
- Cataeno – anoles , G., Gresshoff, P.M. (1998). DNA markers** Potocols, Application, and Overviews. Ed by Cataeno – anoles, G., Gresshoff, P.M. WILEY-VCH New York. Chichester. Weinhein. Brisbane. Singapore. Toronto. 364p
- Chen, X., Roland, F.L.& Leug, H. (1993).** Relationship between virulence and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. *Phytopathology.* **83**: 1489-1497
- Chen, X., Roland, F.L.& Leug, H. (1995).** Virulence and polymorphic DNA Relationship of *Puccinia striiformis*. *Phytopathology.* **85**: 1335-1342
- Chen, W., Shi, X., & Chen, Y.ch. (2002).** Microsatellite markers and clonal genetic structure of the fungal pathogen *Phialophora gregata*. *Mycol. Res*, **106**: 194-202
- Chin K.M. & Wolfe M.S. (1984),** Selection on *Erysiphe graminis* in pure and mixed stands of barley. *Plant Pathol.* **33** : 535-546.
- Chung Wen. H., Tsukiboshi Takao., Ono Yoshitaka & Kakishima Makoto. (2004).** Phylogenetic analysis of *Uromyces viciae fabae*and itsvarieties on *Vicia faba*, *lathyrus* and *Pisum* in Japan. *Mycoscience* **45** (1). <http://www.springerlink.com> .
- Clement J.A., ButtT.M., & Beckett A. (1993 a)** Characterisation of extra cellular matrix

- produced in vitro by urediniospores and sporeling of *Uromyces viciae-fabae*. *Myc .Res*, **97** : 594-602.
- Clement J. A., Martin S.G., Porter R., Butt T.M., & Beckett A. (1993b)** Germination and the role of extra cellular matrix in adhesion of urediniospores of *Uromyces viciae-fabae* to synthetic surfaces characterisation of extra cellular matrix produced in vitro by uredospores and sporeling of *Uromyces viciae-fabae*. *Mycol .Res*, **97**: 587-593.
- Clement J.A., Porter R., & Beckett A. (1998) The orientation of urediniospores of *Uromyces viciae-fabae* during fall and after lading. *Mycol. Res.* **102** (8):907-913.
- Conner R.L., & Bernier C.C. (1981)** Host range of *Uromyces viciae fabae*. *Phytopathol.* **71**: 687-689.
- Conner R.L., & Bernier C.C. (1982a)** Inheritance of resistance in inbred lines of *Vicia faba*. *Can. j. Plant Pathol* **72**:1555-1557
- Conner R.L., & Bernier C.C. (1982b)** Race identification in *Uromyces viciae fabae*. *Can. J. Plant Pathol* **4**: 157-160
- Conner R.L., & Bernier C.C. (1982c)** Slow rusting resistance in *Vicia faba*. *Canadian journal of plant pathology* **4**: 263-265
- Couch, J.A & Fritz, P. (1990)**. Isolation of DNA plants high in polyphenolics. *Pl. Molec. Biol. Reporter* **8**: 8 -12
- Cregan, P. & Quigly, CH.V. (1998)**. Simple sequence repeat DNA marker analysis. In DNA markers Potocols, Application, and Overviews. Ed by *Cataeno – anoles, G., Gresshoff, P.M.* WILEY-VCH New York. Chichester. Weinhein. Brisbane. Singapore. Toronto. pp 173-197.
- Cummins G.B. (1959)** . Illustrated genera of rust fung, Minneapolis, MN.
- Day, P.R. (1987)**. Plant parasite interaction: a genetical perspective. In: Genetic and plant pathogenesis. Ed for the british Society for plant pathology, Blackwell scientific Publications, Oxford. London. Edinbergh. Boston. Palo. Alto. Melbourne, pp 1-10
- Do , N. & Adams, R.P. (1991)**. A simple technique for removing plant polysachride contaminants from DNA. *Biotechniques* . **10**: 162-166
- Dou drick, R.L., Nelson, C.D., & Nance, W.L. (1993)**. Genetic analysis of a single uredospore culture of coronartium quercuum f.sp. fusiforme, using random amplified polymorphic DNA markers. *Mycologia* **85**: 902-911.
- Doyle, J.J. & et Doyle, J.L. (1987)**. A rapid DNA isolation procedure for small quantity of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* **19**: 11-15
- Edwards J., Ades P.K., Parbery D.G., Halloran G.M., & Taylor P.W.G. (1999)** Morphological and molecular variation between Australian isolates of *Puccinia menthae*. *Mycol. Res.* **103**: 1505-1514.
- Edward, M .G., Bickel, Ann., & Weish, P. (1996)**. Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nuleic Acids Res.* **24** (**24**): 5026-5033
- Edwards M.C., & Bowling.D.J.F. (1986)** The growth of germ tubs towards stomata in relation to pH gradient. *Physiol and Mol plant Pathol.* **29**: 185 -196.
- Emeran A. A ., Sillero J.C., & Rubiales D. (2001)** Physiological specialisation of *Uromyces viciae fabae* . **4th** Europeen conference on legumes – 2001 – Cracow. P 263.

- Fang, G., Hammar, S., & Rebecca, R (1992).** A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Bio techniques* **13** : 52 – 56.
- Feliachi, K. (2002).** Le développement des légumineuses alimentaires et les perspectives de relance en Algérie. IN : Proceeding du symposium sur le devenir des légumineuses alimentaires dans le magreb. Hammamet, Tunisie.
- Flor, H.H. (1955).** Host- parasite interaction in flax rust its genetic and other implications. *Phytopathology*. **45**: 680 – 685.
- Flor, H.H. (1956).** The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv. Genet* **8**: 29-54.
- Geistlinger , J., Maqbool, S., Kaiser, W.J. & Kahl, G. (1997).** Detection of microsatellite markers and their Mendelian inheritance in *Ascochyta rabei* . *Mycol. Res.* **101**: 1113-1121.
- Grabo P., & Wagner K.G. (1991)** Early changes in the nucleotide pools of germination rust uredospores. *Journal of phytopatology*. **13 3**: 1-14
- Guyot A.L. (1957)** Les urédinées (ou rouilles des végétaux). Tome III. *Encycl. Mycol.* **29**. 505-554
- Hariot P., (1908)** Les urédinées (rouille des plantes) . Ed o.Doin ; paris ; 392p.
- Hieller S., Mendgen K., & Deising H. (1993).** Cellulotic enzymes of the obligately biotrophic rust fungus *U.viciae-fabae* are regulated differentiation specifically. *Mycol. Res.* **97** (1) : 77-85
- Hiratsuka Y.(1973)** The nuclear cycle and the terminology of spores states in uredinales. *Mycologia*. **65** : 432-443.
- Hurtado, S. & Ramsedt, M. (2002).** AFLP comparaison of distant *Melampsora epitea* (willow rust) population. *Mycol Res.* **106**: 1400-1407.
- Imhoff M.W. Main C.E & Leonard K.L.(1981)** Effect of temperature, dew period, and age of leaves, spores, and source pustule on germination of bean rust uredospores. *Phytopathology* **71**: 577-583
- Jones J.P., Haburan M.A.(1969)** Swelling phenomena of germinating crown rust uredospores. *Phytopathology* **59**: 1034
- Joseph M.E., & Hering T.F . (1997)** Effect of environnement on spore germination and infection by broad bean rust (*Uromyces viciae- fabae*). *Journal of Agricultural Science* (97), **128**: 73-78.
- Kapooria R.G., & Sinha S. (1966)** Studies on the host -range of *Uromyces viciae -fabae*. *Indian Phytopathology*. **29**: 505-554.
- Kapooria R.G., & Sinha S. (1971)** Further studies on the host spectrum of *Uromyces viciae fabae*. *Indian Phytopathol.* **24**: 170-171.
- Keddad A. (1998)** Polyopie, cours de Phytopathologie INA.
- Keiper, F.J., Hayden, M.J., Park, R.F., & We lling, C.R. (2003).** Molecular variation of Australian isolates of five cereal rust pathogens. *Mycol. Res.*, **107**: 545-556
- Kolmer J. A. (1997)** Virulence dynamic and genetics of cereal rust populations in north America. In: gene-for-gene relationship in plant parasite interactions. Ed by *Crute. I R., Holub.E.B. & Burdon J.J. CAB International.* p 139

- Laundon G.F. (1973)** Uridinal Pp. 247-279. In: The fungi, Vol. IVB.EDS. G.C Ainsworth F. K. Sparrow & A.S. Sussman. Academic press, New York.
- Leung, H., Nelson, R.G., & leach, J.E. (1993).** Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Adv. Plant. Pathol.* **10**: 157-205.
- Littelfield L.J., & Heath M.C. (1979)** Utrastucture of rust fungi. Academic press, New York. 277p.
- Lu T.H., & Groth J.V. (1987)** Isosyme detection and variation in *Uromyces appendiculatus*. *Can.J. Bot.* **66**: 885-890
- Maatoughi M .E. H., (1996)** Situation de culture de fève en Algerie et perspectives de relance. In : Proceeding réhabilitation of Faba bean. Ed Bertenbrieter W et Sadiki M. Actes ED. Rabat Maroc, 137-147
- Mac Donald B.A. (1997)** The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* **87** (4). 449-452
- Macclean, D.J., Braithwaite, K.S., Irwin, J.A.G., Manner, J.M. & Groth, J.V. (1995).** Random amplified polymorphic DNA reveals relationships among diverse genotypes in Australian and American collections of *Uromyces appendiculatus*. *Phytopathology*. **85**: 757-765.
- Mac leod B. (1996)** *Faba bean*: Rust disease. Plant Pathologist, Plant research and devleptment Service, Northern. Agriculture Western Australia [http:// www. Agric. Wa. Au/ AGENCY/PUBNS/FARMNOTE/1996/fi_1496.htm](http://www.Agric.Wa.Au/AGENCY/PUBNS/FARMNOTE/1996/fi_1496.htm).
- Macko V., Staples R.C., & Renwick J.A.A. (1970)** Germination of self inhibitor of sunflower and snapdragon rust uredospores. *Phytopathology*. 61:902.
- Macko V., Staples R.C., Renwick J.A.A. & Pirone J. (1972)** , Germination self inhibitor of uredospores. *Physiol. Plant. Pathol.* **2**: 347-355
- Mather K. (1965)** Analyse statistique en biologie. Ed Paris, Herman, 350p.
- Merzenberg R.L. (1991)** Benefactors' lecture: the comportement of molecular biology on mycology. *Mycol. Res.* **95** (1): 1-9.
- Meskine M. (1996)** détermination de la gamme d'hôte d' *Uromyces viciae fabae* pp 135-140 In : Symposium régional sur les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires. 11-14 novembre 1996.
- Messiaem C.M (1981)** variétés résistantes, méthodes de lutte contre les maladies et ennemis des plantes. Ed, INRA, 564p.
- Munoz, G., hirichsen, P., Bryogoo, Y & Giraed, T. (2002).** Genetic characterisation of *Botrytis cinerea* population in chile. *Mycol. Res* **106** (5) : 594 - 601
- Murray ,M.G.,& Tompson, W.F. (1980).** Rapid isolation of hight molecular-weight plant DNA. *Nucleic acids Res.* **8**: 4321-4325.
- Newton, A.C. (1987).** Markers in pathogen poulations. In: Genetic and plant pathogenesis. Ed for the british Society for plant pathology, Blackwell scientific Publications, Oxford. London. Edinbergh. Boston. Palo. Alto. Melbourne, pp 187-194.
- Newton A.C., Caten C.E., Johnson R. (1985).** Variation for isosymes and double stranded RNA among isolates of *Puccinia striiformis* and two other cereal rusts. *Plant. Pathol.* **34**: 235-247

- Pei, M.H., Whelan, M.J., Halford, N.G. & Royle, D.J. (1997)** . Distinction between stem and leaf-infecting forms of *Melampsora* rust on *Salix viminalis* using RAPD markers. *Mycol. Res.* **101**: 7-10
- Pruter C. & Zebitz C.P.W. (1991)** Effect of *Aphis fabae* and *Uromyces viciae fabae* on the growth of a susceptible and an aphid resistance cultivar of *Vicia faba*. *Ann. Appl. Biol.* **119** : 215-226.
- Rafalski, J.A. (1998)**. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In DNA markers Protocols, Application, and Overviews. Ed by *Cataeno – anoles, G., Gresshoff, P.M.* WILEY-VCH New York. Chichester. Weinheim. Brisbane. Singapore. Toronto, pp 75-83
- Rapilly F. (1991)** L'épidémiologie en pathologie végétale : mycoses aériennes. In : *Epidémiologie en pathologie végétale.* (Ed) INRA, Paris, 240-261.
- Rubiales Sillero J.C., Avila C. M. & Carver T. W. L. (2001)** Suppression of resistance to *Uromyces viciae fabae* in faba bean *Vicia faba*. 4th *European conference on grain legumes - 2001- Cracow.* p 258
- Sache I. (1995)** Epidémiologie de la rouille de la féverole . *Phytoma la défense des végétaux N°473*. Juin 1995. pp 40-41
- Sache I. (1994)** La dissémination éolienne des maladies cryptogamiques. *Phytoma la défense des végétaux N°467*. Décembre 1994 pp 20-26
- Saiki R.K., Scharfs, F.F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A & Arnheim, N. (1985)**. Enzymatic amplification of beta globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of Sickle cell anemia. *Science* **230(4732)**: 1350-1354
- Salhi (2005)** . Evaluation de la diversité génétique d'une collection de *Botrytis fabae* et *Botrytis cinerea*., agent de la maladie tache de chocolat. Mémoire de magister INA El Harrach 135p
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989)**. Molecular cloning: A laboratory Manual. 2nd Ed Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Samuel L.H., Allen P.J., Nelson D. & Lester H. (1975)** Mode of action of methyl cis – ferulate, the self inhibitor of stem rust uredospore germination. *Physiol. Plant. Pathol.* **5**: 107-112
- Saville D.B.O. (1985)**. Short- season adaptations in the rust fungi. *Mycologia.* **45** : 75-87
- Schein R.D . (1962)** Storage viability of rust uredospores. *Phytopathology* **52**: 653-657.
- Schein R.D., & Rotem J. (1965)** temperature and humidity effect on uredospores viability. *Mycologia* **57**: 397-403
- Semal J. (1989)** Traité de pathologie végétale. Ed, les presses agronomiques de Gembloux (Belgique). 621p
- Sillero J.C., Monero M .T., & Rubiales D. (200 0)** Characterisation of new sources resistance to *Uromyces viciae fabae* in a germplasm collection of *Vicia faba* *Plant. Pathology* **49**: 389-395
- Sillero J.C., & Rubiales D. (200 2)** Histological characterisation of resistance to bean rust *Uromyces viciae fabae* in faba bean *Vicia faba* *Phytopathology* **92 (3)** : 295-299

-
- Stoddard F.L., Marshall D.R., Ali M. M.H., Fiffer S., Gunasekera S.U.A.K., Herath I.H.M.H.B. & Sherieff S. (1998)** The Australian New Crops Newsletter. Issue N° 10, July 1998 pp 13.
- Stoddard F.L., & et herath I.H.M.H.B. (2001)** Genetic analysis of partial resistance in faba beans. *Aust. J. Agric. Res* **52**: 73-84
- Sussman A .S., & Douthit H.A. (1973)** Dormancy in microbial spores. *Ann. Rev. Plant. Physiol* **24**: 311-352
- Van- Hees -Boukema E.M .& Zedoks J.C.(1986)** Postponed germination of *Puccinia recondita* uredospores deposited on wheat leaves. *Nether lands Journal of Plant Physiology* **92**: 71-80
- Vander Plank J.E. (1968).** La résistance des plantes aux maladies. Agence de coopération technique et culturelle. Paris, 223p.
- Vander Plank J.E. (1978).** Genetic and molécular basis of plant pathogenesis. Springer Verlag Berlin 167pp.
- Vander Plank J.E. (1982).** Host pathogen inter-actions in plant disease. Academic Press ,New york , 207pp.
- Vos, P., Hoger, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A/; Pot, J., Pelemn, J ., Kuiper, M. & Zabeau, M.(1995).** AFLP: a new technique for DNA finger printing. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4407-4414.
- Vos, P. & Kuiper, M.(1998).** AFLP analysis. In DNA markers Potocols, Application, and Overviews. Ed by *Cataeno – anoles, G., Gresshoff, P.M.* WILEY-VCH New York. Chichester. Weinhein. Brisbane. Singapore. Toronto. pp 115-131.
- Wagner A.H., Backer A.I., & Wagner K.G. (1994)** Changes in the nucleoside-nucleotide pools of *Uropomyces viciae fabae* uredospores during imbibition at low temperature *Physiol and Mol Plant Pathol.* **45**: 81-87.
- Wagner A.H., Backer A.I., & Wagner K.G. (1993).** Nucleoside / nucleotide content in *Uropomyces viciae fabae* uredospres and its correlation to germination. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* **43**: 275-281
- Weigand, F., Baum, M & Udupa, S. (1993).** DNA molecular markers techniques. Technical manual N°20. Ed. International center for agriculturere search in the dry area (ICARDA); Aleppo, Syrea.
- Weising, K., Byermann, B., Ramser, J. & Kahl, G. (1991 a).** Plant DNA finger printing with radioactive and digoxigenated oligonucleotide probes complementary to simple repetitive DNA sequences. *Electrophoresis.* **12**: 159-168
- Weising , K., Kaemmer, D., Epplen, J.t., Weigand, F., Saxena, M. & Kahl, G. (1991 b).** DNA fingerprinting of *Ascochyta rabiei* with synthetic oligonucleotides . *Current genetic .* **19**: 483-493
- Weising, K. & Kahl, G. (1998).** Hybridization based on microsatellite fingerprint of plants and fungi. In: DNA markers Potocols, Application, and Overviews. Ed by *Cataeno – anoles, G., Gresshoff, P.M.* WILEY-VCH New York. Chichester. Weinhein. Brisbane. Singapore. Toronto. pp 27-52
- Williams J.G.K., Kube lik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., & Tingey S.V.(1990)** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic*
-

Acids Res. **18 (22)**: 6531-6535.

Yoon, C.H.S., Glawe, D.A. & Shaw, P. D. (1991). A method for rapid small- scale preparation of fungal DNA. *Mycologia.* **83 (6)**: 835-838

Annexes

Annexe 1

Thèmes Recherche de marqueurs biologiques et moléculaires (RAPD) pour l'étude de la diversité génétique d' *Uromyces viciae-fabae*, agent de la rouille de la fève/ féverole.

Uvifs	% de germination après conservation à :						Pouvoir infectieux après conservation à :					
	-20°C		-4°C		T° Amb		-20°C		-4°C		T° Amb	
	Av.	Ap.	Av.	Ap.	Av.	Ap.	Ap.	Av.	Ap.	Ap.	Av.	Ap.
	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav
Uvf1	90	96	87	95	0	25	+	+	+	+	-	+
Uvf2	92	96	88	96	0	26	+	+	+	+	-	-
Uvf3	91	96	86	96	0	25	+	+	+	+	-	-
Uvf4	90	96	87	96	0	25	+	+	+	+	-	+
Uvf5	93	96	87	95	0	25	+	+	+	+	-	+
Uvf6	91	95	87	96	0	24	+	+	+	+	-	-
Uvf7	90	96	88	95	0	24	+	+	+	+	-	+
Uvf8	92	96	87	95	0	25	+	+	+	+	-	+
Uvf9	91	96	87	96	0	26	+	+	+	+	-	-
Uvf10	90	96	86	95	0	26	+	+	+	+	-	-
Uvf11	93	95	88	95	0	25	+	+	+	+	-	+

Tab1 : Récapitulatif du % de germination et du pouvoir infectieux après une semaine de conservation à -20°C, 4°C et à la température ambiante

Uvifs	% de germination après conservation à :						Pouvoir infectieux après conservation à :					
	-20°C		-4°C		T° Amb		-20°C		-4°C		T° Amb	
	Av.	Ap.	Av.	Ap.	Av.	Ap.	Ap.	Av.	Ap.	Ap.	Av.	Ap.
	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav
Uvf1	87	96	83	95	0	10	+	+	+	+	-	-
Uvf2	86	96	82	95	0	9	+	+	+	+		
Uvf3	86	96	81	95	0	9	+	+	+	+	-	-
Uvf4	87	95	83	95	0	8	+	+	+	+	-	+
Uvf5	86	96	82	95	0	9	+	+	+	+		
Uvf6	86	96	82	94	0	8	+	+	+	+	-	-
Uvf7	86	96	81	95	0	9	+	+	+	+	-	-
Uvf8	86	96	82	95	0	9	+	+	+	+		
Uvf9	87	96	82	95	0	9	+	+	+	+	-	+
Uvf10	86	96	83	94	0	7	+	+	+	+	-	-
Uvf11	86	96	83	94	0	10	+	+	+	+		+

Tab2 : Récapitulatif du % de germination et du pouvoir infectieux après 2 semaine de conservation à -20°C, 4°C et à la température ambiante

Isolate	% de germination après conservation à :						Pouvoir infectieux après conservation à						
	-20°C		-4°C		T° Amb		-20°C		-4°C		T° Amb		
	Av	Ap.	Av.	Ap.	Av.	Ap	Ap	Av.	Ap.	Ap.	Ap.	Av.	Ap.
	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	La v	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav
Uv11	87	95	73	94	11	11	+	+	-	+	-	-	
Uv12	83	94	75	94	0	0	+	+	-	+	-	-	
Uv13	88	94	75	94	11	11	+	+	-	+	-	-	
Uv14	85	95	73	94	11	11	+	+	-	+	-	-	
Uv15	88	94	73	94	11	11	+	+	-	+	-	-	
Uv16	88	94	73	94	0	0	+	+	-	+	-	-	
Uv17	85	94	74	95	0	0	+	+	-	+	-	-	
Uv18	85	94	74	94	0	0	+	+	-	+			
Uv19	85	94	75	93	0	0	+	+	-	+			
Uv10	88	95	76	94	0	0	+	+	-	+	-	-	
Uv11	88	95	76	95	0	0	+	+	-	+	-	-	

Tab3 : Récapitulatif du % de germination et du pouvoir infectieux après 4 semaine de conservation à -20°C, 4°C et à la température ambiante

Thèmes Recherche de marqueurs biologiques et moléculaires (RAPD) pour l'étude de la diversité génétique d' *Uromyces viciae-fabae*, agent de la rouille de la fève/ féverole.

Uromyces	% de germination après conservation à :						Pouvoir infectieux après conservation à :					
	-20°C		-4°C		1° Amb		-20°C		-4°C		1° Amb	
	Av	Ap	Av	Ap	Av	Ap	Ap	Av	Ap	Ap	Av	Ap
	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav
Uvf1	78	94	65	94	0	0	+	-	+	+	-	-
Uvf2	78	94	65	93	0	0	+	-	+	+	-	-
Uvf3	79	93	65	93	0	0	+	-	+	+	-	-
Uvf4	77	94	67	93	0	0	+	-	+	+	-	-
Uvf5	77	90	67	90	0	0	+	-	+	+	-	-
Uvf6	78	94	67	93	0	0	+	-	+	+	-	-
Uvf7	78	93	65	93	0	0	+	-	+	+	-	-
Uvf8	77	94	65	92	0	0	+	-	+	+	-	-
Uvf9	78	94	65	93	0	0	+	-	+	+	-	-
Uvf10	70	94	60	90	0	0	+	-	+	+	-	-
Uvf11	79	93	67	92	00	0	+	-	+	+	-	-

Tab4 : Récapitulatif du % de germination et du pouvoir infectieux après 8 semaine de conservation à -20°C, 4°C et à la température ambiante

Uromyces	% de germination après conservation à :						Pouvoir infectieux après conservation à :					
	-20°C		-4°C		1° Amb		-20°C		-4°C		1° Amb	
	Av	Ap	Av	Ap	Av	Ap	Ap	Av	Ap	Ap	Av	Ap
	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav
Uvf1	70	94	60	90	0	0	+	+	+	+	-	-
Uvf2	71	94	63	89	0	0	+	+	+	+	-	-
Uvf3	71	94	62	88	0	0	+	+	-	+	-	-
Uvf4	72	94	67	88	0	0	+	+	+	+	-	-
Uvf5	70	90	64	87	0	0	+	+	+	+	-	-
Uvf6	70	93	62	88	0	0	+	+	+	+	-	-
Uvf7	70	94	62	87	0	0	+	+	+	+	-	-
Uvf8	70	94	63	80	0	0	+	+	-	+	-	-
Uvf9	72	93	67	88	0	0	+	+	+	+	-	-
Uvf10	69	90	61	88	0	0	+	+	+	+	-	-
Uvf11	69	93	63	88	0	0	+	+	-	+	-	-

Tab5 : Récapitulatif du % de germination et du pouvoir infectieux après 12 semaine de conservation à -20°C, 4°C et à la température ambiante

Lentilles	% de germination après conservation à :						Pouvoir infectieux après conservation à :					
	-20°C		4°C		T° Amb		-20°C		4°C		T° Amb	
	Av.	Ap.	Av.	Ap.	Av.	Ap.	Av.	Ap.	Av.	Ap.	Av.	Ap.
	Lav	Lav	Lav	-av	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav
Uv2	49	71	20	32	0	0	+	+	-	-	-	-
Uv3	50	70	22	30	0	0	+	+	-	-	-	-
Uv4	49	69	21	30	0	0	+	+	-	-	-	-
Uv5	49	69	21	31	0	0	+	+	-	-	-	-
Uv6	48	68	20	32	0	0	+	+	-	-	-	-
Uv7	48	68	21	32	0	0	+	+	-	-	-	-
Uv8	40	60	20	32	0	0	+	+	-	-	-	-
Uv9	49	69	22	32	0	0	+	+	-	-	-	-
Uv10	48	69	22	32	0	0	+	+	-	-	-	-
Uv11	49	70	20	32	0	0	+	+	-	-	-	-

Tab6 : Récapitulatif du % de germination et du pouvoir infectieux après 16 semaine de conservation à -20°C, 4°C et à la température ambiante

Lentilles	% de germination après conservation à :						Pouvoir infectieux après conservation à :					
	-20°C		4°C		T° Amb		-20°C		4°C		T° Amb	
	Av.	Ap.	Av.	Ap.	Av.	Ap.	Av.	Ap.	Av.	Ap.	Av.	Ap.
	Lav	Lav	Lav	-av	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav	Lav
Jvf1	20	30	5	3	0	0						
Jvf2	19	31	5	3	0	0	-	-	-	-	-	-
Jvf3	19	32	5	3	0	0	-	-	-	-	-	-
Jvf4	20	32	5	3	0	0	-	-	-	-	-	-
Jvf5	19	31	5	3	0	0	-	-	-	-	-	-
Jvf6	19	30	7	3	0	0	-	-	-	-	-	-
Jvf7	20	30	7	3	0	0	-	-	-	-	-	-
Jvf8	21	30	5	3	0	0						
Jvf9	21	31	5	3	0	0	-	-	-	-	-	-
Jvf10	19	31	5	3	0	0	-	-	-	-	-	-
Jvf11	19	32	5	3	0	0	-	-	-	-	-	-

Tab 7 : Récapitulatif du % de germination et du pouvoir infectieux après 20 semaine de conservation à -20°C, 4°C et à la température ambiante

Abréviations :

Avant lavage : Av. Lav

Après lavage : Av

Annexe 2

Analyse de la variance de l'étude du pouvoir germinatif et infectieux des urédospores

Tableau 1 : Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance 1er semaine

	SCE	DDL	CM	TEST F	PROBA	ET	CV
Variable totale	97541.59	65	1500.64				
VAR facteur 1	4.76	10	0.48	1.2	0.3955		
VAR facteur 2	93548.27	2	46774.14	110056.79	0.0000		
VAR facteur 3	2660.02	1	2660.02	6258.86	0.0000		
VAR F1*F2	7.06	20	0.35	0.83	0.6589		
VAR F1*F3	7.50	10	0.75	1.76	0.1340		
VAR F2*F3	1305.48	2	652.74	1535.86	0.0000		
VAR Res	8.50	20	0.43			0.65	1.0%

Tableau 2 : Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance 2eme^r semaine

	SCE	DDL	CM	TEST F	PROBA	ET	CV
Variable totale	108205,77	65	1664,70				
VAR facteur 1	7,27	10	0,73	1,99	0,0906		
VAR facteur 2	106413,91	2	53206,95	145991,22	0,0000		
VAR facteur 3	1720,74	1	1720,74	4721,44	0,0000		
VAR facteur 3	6,10	20	0,31	0,84	0,6528		
VAR F1*F2	4,44	10	0,44	1,22	0,3378		
VAR F1*F3	46,03	2	23,02	63,15	0,0000		
Var Rés	7,29	20	0,36			0,60	1,0%

Tableau 3 : Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance 4eme semaine

	SCE	DDL	CM	TEST F	PROBA	ET	CV
Variable totale	114554,51	65	1762,38				
VAR facteur 1	4,50	10	0,45	0,97	0,4996		
VAR facteur 2	112000	2	56000,44	120370,38	0,0000		
VAR facteur 3	1437,35	1	1437,35	3089,52			
VAR facteur 3	10,13	20	0,51	1,09			
VAR F1*F2	1,34	10	0,13	0,29			
VAR F1*F3	1091,01	2	545,50	1172,54			
Var rés	9,36	20	0,47			0,68	1,2%

Tableau 4 : Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance 8eme^r semaine

Thèmes Recherche de marqueurs biologiques et moléculaires (RAPD) pour l'étude de la diversité génétique d' *Uromyces viciae-fabae*, agent de la rouille de la fève/ féverole.

	SCE	DDL	CM	TEST F	PROBA	ET	CV
Variable totale	106365,55	65	1636,39				
VAR facteur 1	3,38	10	0,34	1,45	0,2229		
VAR facteur 2	101526,59	2	50763,30	220635,05	0,0000		
VAR facteur 3	3054 ,58	1	3054,58	13276,26	0,0000		
VAR facteur 3	5,0 8	20	0,25	1,10	0,4138		
VAR F1*F2	2,95	10	0,29	1,28	0,3048		
VAR F1*F3	1768,38	2	884,19	3842,99	0,0000		
VAR REs	4,6à	20	0,23			0,48	0,9%

Tableau 5 : Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance 12eme semaine

	SCE	DDL	CM	TEST F	PROBA	ET	CV
Variable totale	97820,27	65	1504,93				
VAR facteur 1	8,76	10	0,88	2,21	0,0630		
VAR facteur 2	91211,13	2	45605,57	115024,88	0,0000		
VAR facteur 3	43,69,23	1	4369 ?23	11019,94	0,0000		
VAR facteur 3	13,88	20	0,69	1,75	0,1097		
VAR F1*F2	5,6é	10	0,56	1,42	0,2426		
VAR F1*F3	2203,72	2	1101,86	2779,04	0,0000		
Var res	7,93	20	0,40			0,63	1,2%

Tableau 6 : Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance 16eme^r semaine

	SCE	DDL	CM	TEST F	PROBA	ET	CV
Variable totale	41353,52	65	636,21				
VAR facteur 1	2,35	10	0,23	0,57	0,8158		
VAR facteur 2	38391,29	2	19195 ?64	47002,25	0,0000		
VAR facteur 3	1782,54	1	1782,54	4364,72	0,0000		
VAR facteur 3	10,38	20	0,52	1,27	0,2984		
VAR F1*F2	7,29	10	0,73	1,78	0 ?1294		
VAR F1*F3	1151 ?50	2	575,75	1409,78	0,0000		
	8,17	20	0,41			0,68	2,3%

Tableau 7 : Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance 20 eme semaine

	SCE	DDL	CM	TEST F	PROBA	ET	CV
Variable totale	8224,48	65	126,53				
VAR facteur 1	1,15	10	0,12	0,17	0,9900		
VAR facteur 2	7447,76	2	3723,88	5536,28	0,0000		
VAR facteur 3	378,24	1	378,24	562,33	0,0000		
VAR facteur 3	7,58	20	0 ?38	0,56	0,8961		
VAR F1*F2	3,09	10	0,31	0,46	0,8968		
VAR F1*F3	373,21	2	186,61	277,43	0,0000		
	13,45	20	0,67			0,82	7,6%

Test de New Man et Keuls de l'étude du pouvoir germinatif et infectieux des urédospores

Tableau 8 : Groupes homogènes 1ere semaine

Thèmes Recherche de marqueurs biologiques et moléculaires (RAPD) pour l'étude de la diversité génétique d' *Uromyces viciae-fabae*, agent de la rouille de la fève/ féverole.

F2 (temperature) libellés	Moyenne	Groupes homogènes
T1	93.50	A
T2	91.27	B
T3	12.55	C
F3 (lavage) libellés	Moyenne	Groupes homogènes
2 AVL	59,42	A
1 APL	72,12	B
F2xF3 libellés	Moyenne	Groupes homogènes
T1 x APL	95.82	A
T2 x APL	95.45	A
T1 x AVL	91.18	B
T2 x AVL	87.09	C
T3 x APL	25,09	D

Tableau 9 : Groupes homogènes 2eme semaine

F2 (temperature) libellés	Moyenne	Groupes homogènes
T1	90,59	A
T2	88,45	C
T3	4,36	D
F3 (lavage) libellés	Moyenne	Groupes homogènes
2 AVL	56,03	
1 APL	66,24	
F2xF3 libellés	Moyenne	Groupes homogènes
T1xAPL	95,27	A
T2xAPL	94,73	B
T1xAVL	85,91	C
T2xAVL	82,18	D
T3xAPL	8,73	E
T3xAVL	0,00	F

Tableau 10 : Groupes homogènes 4eme semaine

F2 (temperature) libellés	Moyenne	Groupes homogènes
T1	90,27	A
T2	84,18	B
T3	0,00	C
F3 (lavage) libellés	Moyenne	Groupes homogènes
2 AVL	53,48	A
1 APL	62,82	B
F2xF3 libellés	Moyenne	Groupes homogènes
T1 x APL	94,36	A
T2 x APL	94,09	A
T1 x AVL	86,18	B
T2 x AVL	0,00	C
T3 x AVL	0,00	D
T3 x APL		D

Tableau 11 : Groupes homogènes 8eme semaine

F2 (temperature) libellés	Moyenne	Groupes homogènes
T1	85,77	A
T2	80,36	B
T3	0,00	C
F3 (lavage) libellés	Moyenne	Groupes homogènes
2 AVL	48,58	A
1 APL	62,18	B
F2xF3 libellés	Moyenne	Groupes homogènes
T1 x APL	93,64	A
T2 x APL	92,91	B
T1 x AVL	77,91	C
T2 x AVL	67,82	D
T3 x AVL	0,00	E
T3 x APL	0,00	E

Tableau 12 : Groupes homogènes 12 eme semaine

Thèmes Recherche de marqueurs biologiques et moléculaires (RAPD) pour l'étude de la diversité génétique d' *Uromyces viciae-fabae*, agent de la rouille de la fève/ féverole.

F2 (temperature) libellés	Moyenne	Groupes homogènes
T1	81,91	A
T2	75,41	B
T3	0,00	C
F3 (lavage) libellés	Moyenne	Groupes homogènes
2 AVL	44,30	A
1 APL	60,58	B
F2xF3 libellés	Moyenne	Groupes homogènes
T1 x APL	93,45	A
T2 x APL	88,27	B
T1 x AVL	70,36	C
T2 x AVL	62,55	D
T3 x AVL	0,00	E
T3 X APL	0,00	E

Tableau13 : Groupes homogènes (test de newman et keuls à5%) 16 eme semaine

F2 (temperature) libellés	Moyenne	Groupes homogènes
T1	58,95	A
T2	26,18	B
T3	0,00	C
F3 (lavage) libellés	Moyenne	Groupes homogènes
2 AVL	23,18	A
1 APL	33,58	B
F2xF3 libellés	Moyenne	Groupes homogènes
T1 x APL	69,18	A
T2 x APL	48,73	B
T1 x AVL	38,55	C
T2 x AVL	20,82	D
T3 x AVL	0,00	E
T3 x APL	0,00	E

Tableau 14 : Groupes homogènes 20 eme semaine

F2 (temperature) libellés	Moyenne	Groupes homogènes
T1	25,,27	A
T2	7,,27	B
T3	0,,00	C
F3 (lavage) libellés	Moyenne	Groupes homogènes
2 AVL	8,,45	A
1 APL	13,,24	B
F2xF3 libellés	Moyenne	Groupes homogènes
T1 x APL	30,91	A
T2 x APL	19,61	B
T1 x AVL	8,82	C
T2 x AVL	5,73	D
T3 X AVL	0,00	E
T3 X APL	0,00	E

Abréviations :

T1 : Température de -20°C

T2 : Température de 4°C

T3 : Température de 18°C (ambiante)

AVL : Avant lavage

APL :Après lavage

Analyse de la variance du test du pouvoir pathogène

Tableau 16: Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance du test du pouvoir pathogène

	SCE	DDL	CM	TEST F	PROBA	ET	CV
Variable totale	92.90	65	1.43				
VAR facteur 1	27.60	10	2.76	2.76	0.0086		
VAR facteur 2	15.37	5	3.07	3.08	0.0169		
VAR résiduelle	49.93	50	1.00			1.00	35.4%

Test de New Man et keuls appliqué au test du pouvoir pathogène

Tableau 17 : Test de Newman et Keuls – seuil = 5% : Facteur 1 : Isolats

F1 libelles	Moyennes	Groupes homogènes
UVF 8	4.63	A
UVF 11	3.20	B
UVF 10	3.12	B
UVF 6	2.70	B
UVF 1	2.70	B
UVF 2	2.60	B
UVF 4	2.59	B
UVF 5	2.47	B
UVF 7	2.47	B
UVF 9	2.37	B
UVF 3	2.15	B

Facteur 2 : cultivar

F2 libelles	Moyennes	Groupes homogènes
V2	3.79	A
V3	3.06	AB
V4	2.61	B
V1	2.60	B
V5	2.50	B
V6	2.37	B

Abréviation :

V1, V2.....etc = variétés ou cultivar

Annexe 3

Pour les trois protocoles d'extraction de l'ADN génomique l'étape 1, qui consiste en un broyage des urédospores dans une mixture de sable, d'azote liquide et de peroxyde d'hydrogène, a été rajouter à ces protocoles. Celle ci été une étape clé pour la réussite des extration par les 3 protocoles. La prévention conte l'effet du peroxyde d'hydrogéné a été envisagée par l'ajonction de PVP (poly-venyl pyrolidon) à une concentration de 2%.

Protocole d'extraction de l'ADN basé sur la méthode SDS

Broyer 100 mg d'urédospores dans une mixture de sable, d'azote liquide et de quelque microlitre de peroxyde d'hydrogène, puis mettre le broyat dans un tube de 2ml. et rajouter qlq ul de PVP pour prévenir l' oxydation des extrait par le H2O2.

Ajouter au broyat 1ml de tampon de lyse (50 Mm Tris-Hcl pH8 et 100 Mm EDTA) à 65°c.

Ajouter 100ul de SDS 20%, homogénéiser et incuber à 65 °c pendant 15mn.

Ajouter 300 µl d'acétate de potassium (5M) et laisser agir pendant 20 mn dans de la glace pilée, puis centrifuger à 12 000 rpm pendant 10 min.

Récupérer la phase aqueuse supérieure dans un tube de 1.5 ml et précipiter l'ADN avec de l'isopropanol froid, laisser agir pendant 30 min au congélateur.

Centrifuger pendant 5min à 12 000rpm, le culot ainsi obtenu contient de l'ADN.

Éliminer avec précaution le surnageant et égoutter le tube en le mettant en position renversée sur du papier absorbant.

Laver le culot avec 300 µl d'éthanol à 75 % (mettre les 300 µl puis centrifuger pendant 5min à 12 000rpm et éliminer le surnageant comme dans l'étape 7), répéter l'étape 8 trois fois.

Après avoir sécher le culot, resuspendre dans 50 µl de TE (Tris – EDTA) et maintenir à 4° c .

Protocole d'extraction de l'ADN basé sur la méthode SDS/ CTAB

Broyer 100 mg d'urédo-spores dans une mixture de sable, d'azote liquide et de quelque microlitre de peroxyde d'hydrogène, puis mettre le broyat dans un tube de 2ml. et rajouter qlq µl de PVP pour prévenir l' oxydation des extrait par le H₂O₂.

Transférer la poudre dans des tubes de 2ml

Ajouter 1ml de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl et 100 mM EDTA)

Mélanger et ajouter 60 µl d' SDS 20 % et agiter doucement à 20 °c pendant 1 h.

Ajouter 130 µl de CTAB / NaCl (10% CTAB, 0,7 M NaCl) et incuber 65°C pendant 20mn

Éliminer le culot constitué de sable et débris de spores.

Diviser la mixture dans 2 tubes 1,5ml

Ajouter à volume égale du chloroforme / alcool isoamylique (24 : 1)

Transférer la phase aqueuse supérieure dans un tube de 1,5 ml (2 tubes)

Ajouter 500 µl d'isopropanol froid et incuber à 4°C pendant 20mn

Centrifuger à 10000 rpm pendant 20mn à 20°C

Rincer à 2fois la pelote avec de l'éthanol froid à 70%

Sécher la pelote et déssoudre dans 50 µl de TE (10 mM Tris-HCl et 1mM EDTA pH 8)

garder à – 20 °C

Protocole d'extraction basé sur l'utilisation de CTAB

Broyer 100 mg d'urédo-spores dans une mixture de sable, d'azote liquide et de quelque microlitre de peroxyde d'hydrogène, puis mettre le broyat dans un tube de 2ml. et rajouter qlq µl de PVP pour prévenir l' oxydation des extrait par le H₂O₂.

rajouter 1ml du tampon CTAB (100ml CTAB+100µlmercapto ethanol) préchauffé à 65°C et incuber à la même température pendant 1h, puis incuber les tubes pendant 5mn

Thèmes Recherche de marqueurs biologiques et moléculaires (RAPD) pour l'étude de la diversité génétique d' *Uromyces viciae-fabae*, agent de la rouille de la fève/ féverole.

au congelateur.

Rajouter 900 ul de chloroforme alcool isoamylique (24 : 1), agiter doucement sur l'agitateur pendant 20 mn, et centrifuger à 10 000 rpm pendant 10 mn.

Transférer la phase aqueuse dans un autre tubes, puis répéter l' étape 3

Transférer le surnageant dans un autre tubes de 2 ml.

Rajouter 2/3 volume (660 ul) d'isopropanol froid (-20°c), puis agiter doucement pour précipiter les acides nucléiques et incubé pendant 30mn au congelateur.

Centrifuger à 10 000rpm , puis éliminer le surnageant en gardant la pelote d'acides nucléiques et rajouter 1ml d'éthanol froid (75%).

Centrifuger encore une fois à 10 000 rpm et répéter l'étape de l'éthanol.

Dissoudre l'ADN dans 50 ul de TE et conserver à 4°c .

Solutions stocks pour tampons

1- Tris-HCl 1M,

Tris	12,11g
HCl 12N qsq	pH 8
H2O qsq	100ml

2- Tris – Hcl 2M,

Tris	24,22g
HCl 12N qsq	pH8
H2O qsq	100 ml

3- EDTA 1M, pH8

EDTA di-sodique	37,2 g
H2O qsq	100ml

4- EDTA 0,5M, pH8

EDTA di-sodique	18,6 g
H2O qsq	100ml

5-NaCl 5M

NaCl	29,22 g
H2O qsq	100ml

6-SDS 20% (préparation chauffer à 68°C)

S D S	20 g
H2O qsq	100ml

8- TBE 10 X (pour la cuve il faut du TBE 1X)

Tris base (Trizine 7-9)	108g
Acide borique	55g
EDTA	9,3g
H2O qsq	11

9- TAE 10X

Tris base	84,4 g
Acide acétique glacia	11,4 g
EDTA 0,5 M	20ml
H2O qsq	11

10- Tampon de charge

Bromophénol blue 0,25%	0,13 g de B b
Xylène cyanol 0,25%	0,13 g de X c
Glycérol 30% (P/V)	15 g de Glycérol
H2O qsq	50 ml