

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

سطيف عباس فرحات جامعة

Université Ferhat Abbas Sétif

MEMOIRE

Présenté à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

Pour l'obtention du Diplôme de

MAGISTER

EN MICROBIOLOGIE

Option : Génie Microbiologique

Par

M^{me} MERZOUKI.BOUZID DJIHANE

THEME

**Etude de la production et de l'activité biologique de
solanapyrone A**

Président : Larbi LAROUS

Encadreur : Mohamed Mihoub ZERROUG

Examineur : Daoud HARZALLAH

Examineur : Rachid BELHATTAB

Professeur

MCA

Professeur

MCA

UFAS Sétif

UFAS Sétif

UFAS Sétif

UFAS Sétif

2011

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le bon Dieu de m'avoir aidé à réaliser cet ouvrage.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Dr Zerroug, qui a dirigé ce travail avec rigueur et patience et mon fait bénéficier de ces compétences, qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements

Je remercie Dr Chouchen le chef de département de pharmacie, faculté de médecine, université Sétif, pour son aide.

Je remercie l'ensemble du jury, qui m'a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Je remercie tous les enseignants de mon cursus universitaire qui ont Contribué à ma formation et surtout merci à Mr Khenchouche.

Mes vifs remerciements vont, également, à tous les ingénieurs de laboratoire du département de pharmacie sans exception pour leur aide.

Un grand merci à Mohamed Khalil Ferhat qui ma donné un coup de main dans
L'informatique

Enfin, il me serait difficile d'omettre de remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Qu'ils trouvent dans ses quelques lignes l'expression de mes sincères remerciements.

A tous mes amis Ainsi qu'à tous ceux qui me sont chers.

DJHANE

Dédicace

Je dédie affectueusement ce mémoire :

A mes très chers parents avec toute ma reconnaissance.

A ma chère maman qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Ni sacrifices, ni privations ne l'ont empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ses enfants.

A mon cher papa qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.

A SAMIR qui était toujours à mes côtés et qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager: Jamais de simples mots ne me permettront de t'exprimer mes remerciements mon très cher mari.

A mes adorables enfants qui comble notre bonheur

MOUHAMED ELHADJ et RAHMA

A mon beau père et ma belle-mère pour leur soutien durant ce travail

A mes frères : Farek, Amine, Ali, Ahmed

et mes beaux-frères : Moufid et Boualem

A mes belles sœurs

A tous mes amis qui sont m'encourager pour compléter cette thèse

Sommaire

	<i>Pages</i>
Introduction	01
1- Revue bibliographique	03
1-1- Les relations plantes-agents pathogènes	03
1-2- Les champignons	04
1-3- Production des métabolites secondaires	04
1-4- Les toxines	05
1-5- L'antracnose du pois chiche	06
1-6- L'agent pathogène	07
1-7- Les solanapyrones	10
1-1-7-1- Solanapyrone A	11
1-7-2 - La biosynthèse de solanapyrone A	13
2- Matériel et méthodes	14
2-1- Matériel biologiques	14
2-2- Milieux de culture	16
2-3- Méthodologie de travail	16
3-Résultats	22
3-1-L'effet des milieux sur la production de solanapyrone A	22
3-2-Effet inhibiteur de solanapyrone A sur l'élongation des hypocotyles	23
3-3-Activité antibactérienne de solanapyrone A	24
3-4- L'effet des extraits de plantes sur la croissance mycélienne	27
3-5- L'effet antagoniste des bactéries sur la croissance fongique <i>in vitro</i>	28
3-6- Effets des filtrats de <i>Bacillus megaterium</i> et <i>Pseudomonas fluorescens</i>	30
sur la croissance mycélienne	
3-7-L'effet des extraits de plantes et filtrats de bactéries sur la production de solanapyrone A	32
4- Discussion	38
5- Conclusion	52
6- Perspectives	54
7- Résumé	55
8- Bibliographie et annexe	56

INTRODUCTION

La biochimie et la physiologie des champignons pathogènes et leur interaction avec l'hôte a été caractérisée extensivement (Heifussan et Williams, 1996). Mais les molécules essentielles pour la pathogénèse ne sont pas encore bien définies (Bennett et Lasure, 1991).

Tout composé produit par un microorganisme, qui est toxique pour les plantes est une phytotoxine. Il joue un rôle causal de produire des caractéristiques de la maladie chez les plantes sensibles (Wheeler et Luke, 1963). Plusieurs espèces de champignons produisant des toxines causent des maladies des plantes dans des conditions de terrain. Il était donc bien à remettre en question le rôle des toxines dans la pathogénèse de la plante ainsi que leur participation à des maladies animales et humaines. Les conditions essentielles pour l'attribution de la fonction d'un déterminant de la maladie à une toxine sont: (1) la démonstration que la toxine est produite dans les plantes infectées ; et (2) la capacité de la toxine de causer au moins une partie du syndrome lorsqu'elle est dans des plantes saines (Adams *et al.*, 1998).

L'antracnose du pois chiche causée par *Ascochyta rabiei* (anamorphe), *Didymella rabiei* (téléomorphe) est la maladie la plus grave de cette culture dans le monde. En Algérie, c'est la maladie majeure et les pertes de rendement pourraient être totales (Bouznad *et al.*, 1996).

Ascochyta rabiei présente des variations considérables dans la pathogénicité et les mécanismes par lesquels il infecte et colonise les plantes de pois chiche et qui demeurent incomplètement comprises. Les recherches indiquent que *A. rabiei* peut infecter les plantes par pénétration directe (Höhl *et al.*, 1990). L'agent pathogène produit également des toxines des solanapyrones, et ces toxines peuvent provoquer des symptômes semblables à ceux causés par l'agent pathogène (Hamid et Strange, 2000). En outre, cet agent pathogène produit des

cutinases, qui se sont révélés être un facteur de virulence chez d'autres champignons (Dickman *et al.*, 1989).

Ce mémoire est divisé en deux parties : la première partie est une étude bibliographique sur l'interaction hôte-pathogène et la maladie de l'antracnose, la deuxième partie est une étude des tests pratiques sur l'effet des différents milieux sur la production de solanapyrone A, l'effet inhibiteur de ce dernier sur l'élongation des hypocotyles des différents génotypes de pois chiche, l'effet antibactérien de solanapyrone A sur des bactéries pathogènes, l'effet antifongique des extraits naturels et des filtrats de bactéries sur la croissance mycélienne de champignon et leur effet sur la production de solanapyrone A.

Notre objectif était donc de vérifier l'effet des différents milieux sur la production de solanapyrone A.

Revue bibliographique

Les microorganismes interagissent avec les plantes qui leurs offrent une grande diversité d'habitats dont la phyllosphère (partie de la plante aérienne), de la rhizosphère (zone du système racinaire) et de l'endosphère (système de transport interne) (Lindow *et al.*, 2002 ; Lynch,1990). Les interactions des épiphytes, rhizophytes ou endophytes peuvent être préjudiciable ou bénéfique pour le microorganisme ou la plante et peuvent être classifiées comme neutralisme, commensalisme, synergie, mutualisme, d'amensalisme, compétition ou de parasitisme (Montesinos, 2003).

1.1 Les relations plantes-agents pathogènes

Lors de leur cycle de vie, les plantes sont confrontées à des stress divers, de nature abiotique (chaleur, froid, sécheresse,..) et biotique (microorganismes, insectes ravageurs, herbivores) (Mauch-Mani et Métraux, 1998).

Les agents pathogènes de plantes peuvent être classés en deux catégories : ceux qui tuent leur hôte et se nourrissent de son contenu (nécrotrophes) et ceux qui ont besoin d'un hôte vivant pour se nourrir et compléter leur cycle de développement (biotrophes). Cette classification est indépendante du fait que l'infection peut conduire éventuellement à la mort de la cellule hôte.

Au champ, plantes et microorganismes pathogènes sont constamment en contact. Les barrières physiques et chimiques tels que la cuticule, la paroi cellulaire et les composés antimicrobiens produits constitutivement protègent la plante contre la majorité des tentatives d'intrusion des microbes: Dans le cas où un agent pathogène est capable de passer ces barrières on distingue deux types d'interactions selon la réponse de la plante. Soit elle arrête

le parasite après sa reconnaissance et on aura une interaction incompatible, la plante est dite résistante et l'agresseur avirulent; soit le développement du parasite s'effectue et on a une interaction compatible, la plante est alors sensible et le microorganisme pathogène est dit virulent (Jones et Dangl, 2006).

1.2 Les champignons

Les champignons sont le plus important groupe de pathogène, l'infection se fait souvent par une ouverture naturelle, stomates, lenticelles, blessures, grâce à la synthèse d'enzymes hydrolytique et à la pression mécanique d'un organe spécial, l'appressorium, vésicule de fixation et de pénétration. Dans l'hôte, le champignon émet des toxines multiples. Les champignons nécrotrophes (comme *Botrytis*), peu spécifiques, dégradent les parois de la cellule hôte. Les champignons biotrophes (comme *Plasmopora*), très spécifiques, développent un haustorium (=suçoir) au contact de la membrane plasmique de la cellule hôte vivante. L'haustorium augmente la surface d'échanges de drainer de l'eau et les nutriments de l'hôte vers le champignon. D'autres espèces sont hémibiotrophes, (comme *Colletotrichum*) responsable de l'antracnose du haricot présentent typiquement une courte phase d'exploitation biotrophe suivi d'une phase d'exploitation nécrotrophe (Lepoivre, 2003).

1.3 Production des métabolites secondaires

La production des métabolites secondaires commence généralement à la fin de la croissance, en entrant à la phase stationnaire (Bu'Lock, 1961). Et ils sont souvent associés à des processus de sporulation chez les microorganismes (Kronstad *et al.*, 1998 ; Mapleston *et al.*, 1992 ; Stone et Williams 1992), y compris les champignons (Bu'Lock, 1961). Les métabolites secondaires associés à la sporulation peuvent être placés en trois grandes catégories: (i) les métabolites qui activent la sporulation (par exemple, les dérivé d'acide linoléique produits par *A. nidulans* (Champe et Zayat, 1989 ; Calvo *et al.*, 2001), (ii)

pigments requis pour les structures de sporulation (par exemple les mélanines nécessaires à la formation ou l'intégrité des spores sexués et asexués (Alspaugh *et al.*, 1997 ; Kawamura *et al.*,1999) et (iii) métabolites toxiques sécrétés par des colonies en croissance à temps approximatif de la sporulation (par exemple la biosynthèse de certains produits naturels préjudiciables tels que les mycotoxines(Trail *et al.*, 1995 ; Hicks *et al.*, 1997).

1.4 Les toxines

Tout composé produit par un microorganisme, qui est toxique pour les plantes est une phytotoxine. Il joue un rôle causal et produit des symptômes de la maladie chez les plantes sensibles (Wheeler et Luke, 1963). Bon nombre de bactéries pathogènes des plantes et champignons produisent des phytotoxines dans la culture et à leurs hôtes (Höhl *et al.*, 1990).

Les toxines qui affectent les plantes sont divisés en deux catégories : des toxines hôtes-sélectives (HST),affecte seulement les plantes hôtes de l'organisme producteur de la toxine, et des toxines non sélectives (NST), causant des symptômes non seulement sur les hôtes de l'agent pathogène, mais sur d'autres plantes. Ainsi HST est habituellement essentielle pour la pathogénicité, c'est-à-dire la capacité de causer la maladie. En conséquence, le rôle de HST dans la maladie est rarement contesté. En revanche, les NST ne sont pas essentielles pour la pathogénicité mais peuvent être contribué à la virulence et il y a souvent des arguments à leur rôle dans la maladie. Les arguments principaux sont : si une toxine synthétisée par un agent pathogène *in vitro* est également synthétisée dans la plante et si la présence de la toxine dans la plante est une condition préalable pour attribuer un rôle pour elle dans la maladie. Ce dernier point est particulièrement controversé, puisqu'on peut soutenir que l'absence de la toxine dans la plante infectée peut-être un indicateur de la transformation ou du métabolisme de cette toxine (strange, 2003).Les symptômes physiques causés par les toxines sur une plante infectée (le flétrissement, chlorose et nécrose) peuvent être facilement observés à l'œil nu dans de nombreux cas, mais la lésion primaire est habituellement biochimique,

certain agents pathogènes produisent du matériel qui bloque la conductivité de l'eau de la plante en causant des embolies (Hamid et Strange, 2000). L'antracnose causée par *Ascochyta rabiei* est la maladie la plus dommageable du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) (Chen et Strange, 1994). Les symptômes apparaissent sur toutes les parties de la plante en produisant des lésions nécrotiques qui peuvent entraîner la destruction de la plante (Nene, 1982; Shtienberg *et al.*, 2000),

1.5 L'antracnose du pois chiche

L'antracnose a d'abord été signalés au Pakistan, et elle touche au moins 35% de la culture de pois chiches dans le monde principalement, en Amérique latine, en Bulgarie et en Amérique du Nord (Kaiser *et al.*, 2000a ; Nene *et al.*, 1996), la maladie a été introduite en Saskatchewan, au Canada grâce à l'introduction de matériel génétique de pois chiche infecté (Morrall et McKenzie, 1974). Aussi cette maladie a été enregistrée en Asie occidentale, l'Afrique du Nord et au sud de l'Europe. La production de pois chiche est limitée par cette maladie (Nene 1982). La première apparition de l'antracnose en Australie du Sud a été signalé en 1973 (Khan *et al.*, 1999). L'agent causal de L'antracnose du pois chiche est le champignon *Ascochyta rabiei* (Pass) Labrousse (téléomorphe: *Didymella rabiei* (Kovachevski) *v. Arx Syn Mycosphaerella rabiei*) (Khune et Kapoor, 1980). C'est un champignon nécrotrophe à pénétration directe, capable d'infecter toutes les parties aériennes du pois chiche (*Cicer arietinum*). Lors de la germination des spores et de l'infection, les tubes germinatifs sécrètent une substance mucilagineuse qui facilite la fixation à la surface de l'hôte. Après la fixation, le champignon envahisseur produit des enzymes lytiques pour dégrader la paroi cellulaire ce qui facilite la pénétration dans l'hôte. En plus il produit plusieurs phytotoxines (solanapyrones A, B et C, cytochalasine D et une toxine protéique) qui

semblent responsables de la nécrose et de la mort des cellules (Chen et Strange, 1994 ; Jayakumar *et al.*, 2005).

1.6 L'agent pathogène

Ascochyta rabiei est hétérothallique avec un système d'accouplement, les deux types d'accouplements ont été appelés MAT1-1 et MAT1-2 (Kaiser, 1997; Armstrong *et al.* 2001 ; Taleei *et al.*, 2008), La recombinaison sexuelle des *A. rabiei* produit une plus grande diversité génétique et génotypes plus virulents de l'agent pathogène (Kaiser, 1997), des étapes anamorphe et telomorphe dans le cycle de la maladie de L'antracnose du pois chiche est illustré à la Figure 1 (Kanouni, 2011).

L'anamorphe (stade asexué) (*Ascochyta rabiei*) est caractérisé par la présence sphériques des pycnides brun foncé, à forme de poire ostiolés et varie généralement de la taille de 80 à 240 x 60-215µm, ces pycnides contenant des pycnidiospores ovales à oblongues, droites ou légèrement pliés à ses deux extrémités, contiennent des spores hyalines sur des conidiophores courts noyé dans une masse mucilagineuse, survenus sur la matière vivantes ou morte de pois chiche et ils peuvent être vus comme des points, intégrés dans le tissu hôte (Sattar, 1934 ; Luthra *et al.*, 1935). Toutefois, la taille des pycnidiospores obtenus à partir de l'hôte par Kovashevski (1936) ont été de 6.0 à 16.0 x 3.4 à 5.5 µm et sur des milieux artificiels de 4.8 à 14.0 x 3.2 à 5.2 µm.

Le téléomorphe (stade sexué) (*Didymella rabiei* (Kovachevski) v. Arx) se caractérise par des pseudothèces brun foncé à noir sur les débris de pois chiche d'hiver et sont sous-globuleux, 120-270 µm de diamètre et disposés en rangées du tissu hôte (Trapero-Casas et Kaiser, 1992a), le développement des pseudothèces ne nécessite pas d'autres nutriments que celles prévues par les débris de pois chiche (Trapero-Casas et Kaiser, 1992b), des pseudothèces font saillie en dehors des asques cylindriques, à 8-spores de 50-80 x 10-12 µm avec une paroi bituniqués (Trapero-Casas et Kaiser, 1992a) (Fig. 2).

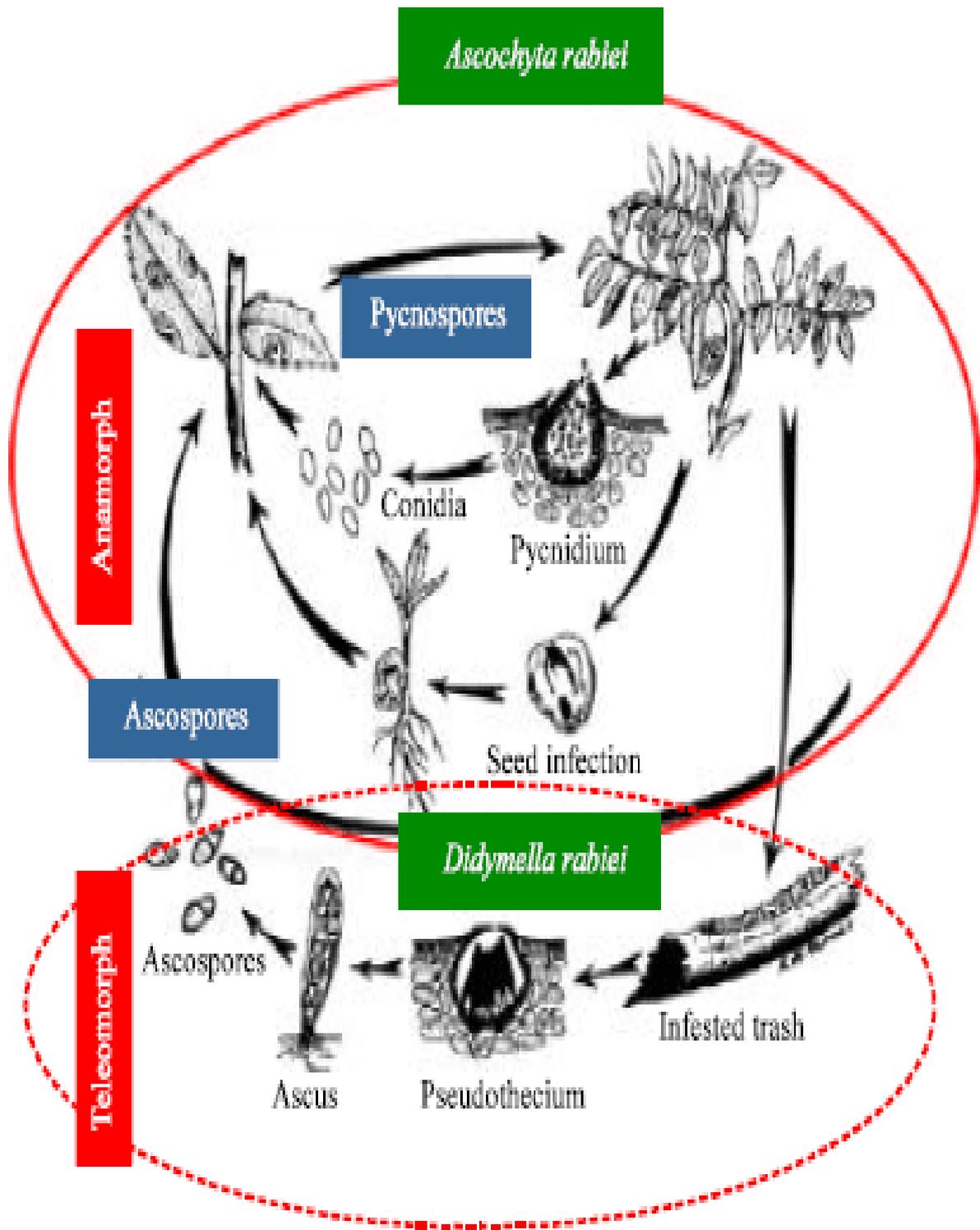
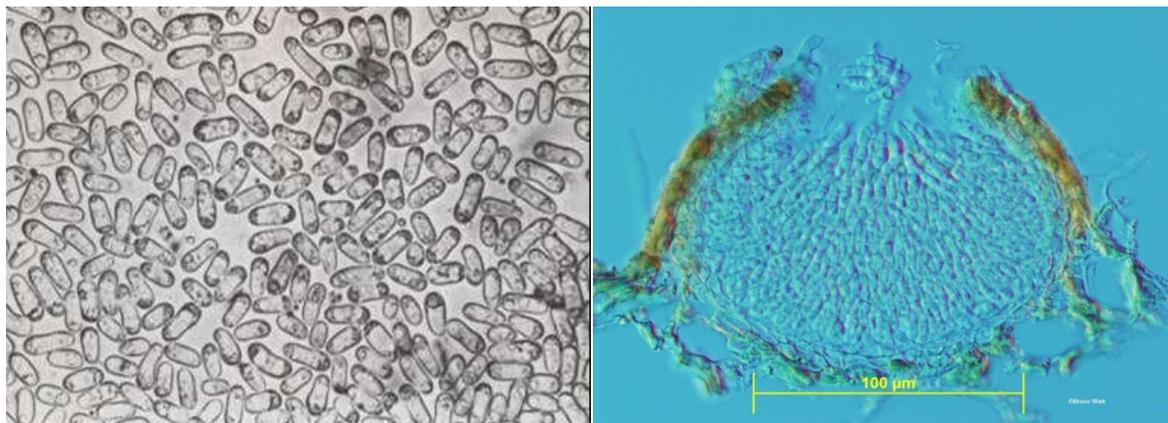
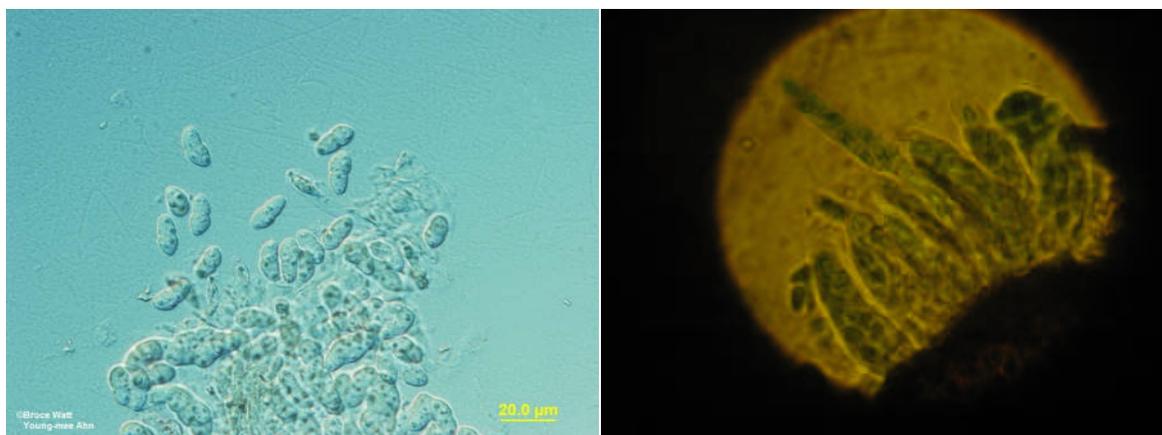


Figure1 : le cycle de vie de l'antracnose du pois chiche (Kanouni, 2011).



(a)

(b)



(c)

(d)

Figure 2 : (a) et (b) présentent les pycnidiospores et pycnide qui contient des pycnidiospores d'*Ascochyta rabiei* dans le stade asexué.

(c) et (d) présente les ascospores et les pseudothèces mures de stade sexuée.

(a) Pycnidiospores d'*Ascochyta rabiei* (Haware *et al.*, 1986)

(b) (Anonyme, 2011)

(c) (Anonyme, 2011)

(d) (Kanouni, 2011).

1.7 Les solanapyrones

Plusieurs phytotoxines ont été isolées et identifiées chimiquement mais seules quelques-unes d'entre elles produites par les champignons pathogènes ont été étudiées dans la mesure où leurs rôles dans les maladies des plantes sont clairement définies (Yoder, 1980).

Les nécroses causées par *Ascochyta rabiei* sont associée avec la sécrétion des phytotoxines, et les symptômes suggèrent l'implication des phytotoxines dans la maladie fongique du pois chiche et que le filtrat de culture libre de ce champignon contient des composés toxiques, chimiquement identifiés comme solanapyrones A, B et C. (fig.3) (Höhl *et al.*, 1991 ; Alam *et al.*, 1989) et la cytochalsine (Latif *et al.*, 1993).

Les solanapyrones A, B, C ont d'abord été trouvées comme produits d'*Alternaria solani*, agent causal du la brûlure tardive de tomate et la pomme de terre (Ichihara *et al.*, 1983; Jayakumar *et al.*, 2005). L'agressivité d'*A.rabiei* a été positivement corrélée avec la production des phytotoxines (Kaur, 1995). Dans des études de Shahid *et al.*, (1998) les solanapyrones et la cytochalsine D ont été purifiée d'*A.rabiei* cultivé sur le milieu liquide de Czapek Dox additionné de semences de pois chiche.

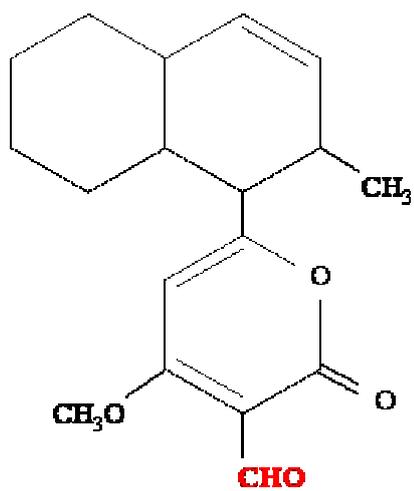
La toxicité du composé purifié déterminé par des tests biologiques sur les cellules du pois chiche était dans l'ordre de gravité : solanapyrone A>solanapyrone B>solanapyrone C.

Cependant, la spécificité de tous les trois composés dépendait de l'identité génétique des cultivars de pois chiches utilisé comme source de cellule. Shahid et Riazuddin (2000) ont isolés les phytotoxines, solanapyrones A, B et C de filtrats de culture d '*A. rabiei* lorsqu'il est cultivé sur le milieu Czapek dox additionnés de cations métalliques bivalents. Les solanapyrones A et C ont déjà été signalés chez ce champignon mais la solanapyrone B était un nouveau composé de cette espèce. Höhl *et al.*, (1991) ont trouvé des solanapyrones B et C dans les fluides contenant des spores fongiques en germination, ce qui suggère qu'ils pourraient jouer un rôle précoce dans le développement de la maladie.

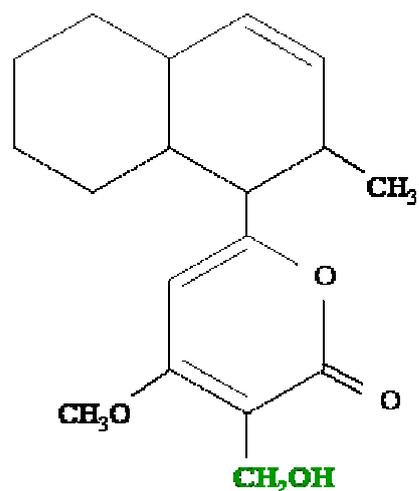
Des études précédentes de Latif *et al.*, (1998) ont ssimilées la production des substances toxiques par *A.rabiei* dans le milieu de croissance et les phytotoxines isolées capables d'infecter artificiellement des plantes de pois chiche. Afin de faire avancer les études du rôle des composés toxiques dans la pathogénicité fongique sur le terrain, ces toxines ont été recueillies et analysées, les résultats montrent l'absence de solanapyrone A, faible niveau de solanapyrone B et C et un niveau élevé de cytochalasine D chez les cultivars susceptibles et aucun composé phytotoxique ne pourrait être retrouvé sur des cultivars résistants à la maladie.

1.7.1 Solanapyrone A

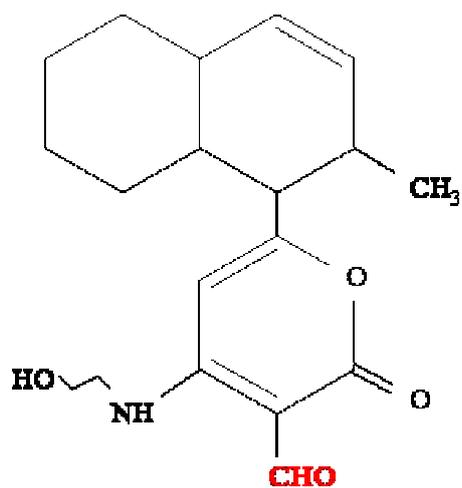
Le flétrissement par l'altération de la fonction des membranes, dans lequel les espaces intercellulaires deviennent envahis de champignon est un des symptômes causées par l'agent pathogène *Ascochyta rabiei*. Dans une expérience, le flétrissement aigu a été démontré dans les boutures de pois chiche exposés à des faibles concentrations de solanapyrone A, la plus toxique des trois toxines produites par *Ascochyta rabiei*. Les feuilles de la plante s'affaissent et leurs pétioles rompirent, un symptôme qui est typique de l'antracnose. L'interprétation de ce résultat était que la plante se fonde sur la pression de turgescence des cellules entourant la stèle de soutien et, lorsque cela est détruit par la toxine et les parties distales effondrent sous leur propre poids (Hamid et Strange, 2000). L'idée que l'atteinte de la membrane était responsable des symptômes, est donnée créance à détecter et isoler les toxines causant la nécrose (l'étape qui suit la disparition des cellules végétales après le flétrissement) et la chlorose peut résulter de la perturbation du métabolisme de la chlorophylle, mais sa relation à l'activité de la toxine peut être plutôt indirecte (strange, 2003).



Solanapyrone A



Solanapyrone B



Solanapyrone C

Figure 3 : Structures chimiques des solanapyrones A, B et C.

1.7.2 La biosynthèse de solanapyrone A

Les solanapyrones ont été signalés comme facteurs de virulence d'antracnose dans plusieurs espèces ; elles sont connues pour être produites par une voie de polycétide synthase réduit (RD- PKS). Certaines informations préliminaires sur les protéines impliquées dans la synthèse de solanapyrones sont disponibles. Cependant, les gènes impliqués dans leur production n'ont pas été clonés d'*Ascochyta rabiei*. Les solanapyrones sont très réactifs et très difficiles à détecter in vivo (Shahid et Riazuddin, 1998).

L'étude de Javier, (2011) a l'objectif de cloner et de caractériser une ou plusieurs gènes de polycétide synthase (PKS) associés à la production de solanapyrones en *Ascochyta rabiei*, afin d'établir leur rôle dans la biosynthèse de solanapyrone et de leur effet sur la pathogénicité du champignon. Aucune information sur la séquence nucléotidique étant disponible pour ce champignon, le clonage a été lancé en alignant sept séquences protéiques RD-PKS disponibles dans Genbank, en sélectionnant les régions conservées d'amorces dégénérées. La séquence de 1083 pb obtenue à la suite de cet effort a été trouvée est elle été semblable à un RD-PKS impliqués dans la production de métabolites secondaires du champignon nécrotrophe *Botryotinia fuckeliana*, l'agent causal de la pourriture grise. Cette séquence est actuellement utilisée comme une sonde à une bibliothèque de phage du génome d'*A.rabiei* à fin d'un progrès vers le clonage des gènes polycétide synthase d'*A. rabiei*. Le groupe de gènes de biosynthèse de solanapyrone A été cloné d'*Alternaria solani*. Il se compose de six gènes sol 1–6 codant pour une polycétide synthase, un O-méthyltransférase, une déshydrogénase, un facteur de transcription, une oxydase flavine dépendante et cytochrome P450. La synthase prosolanapyrone (PSS) codée par sol 1 a été exprimée chez *Aspergillus oryzae* et son produit a été identifié comme desmethylprosolanapyrone (8). Sol5, codant une oxydase flavine dépendante (solanapyrone synthase, SPS), a été exprimée et purifiée dans *Pichia pastoris*(Kasahara *et al.* ,2010)

MATERIEL ET METHODES

Ce chapitre décrit la démarche suivie afin d'aboutir aux résultats finaux.

2.1 Matériel biologiques

2.1.1 La souche d'*Ascochyta rabiei*

La souche d'*Ascochyta rabiei* Tk-21, obtenue du laboratoire de Dr Strange (University of London).

2.1.2 Les souches bactériennes

Pour les tests d'activité antibactérienne, six souches bactériennes pathogènes ont été utilisées dont trois souches ATCC et les trois autres ont été isolées et identifiées au Laboratoire de recherche et d'analyses médicales de CHU de Sétif, Algérie (Tab.1.). Ces six souches sont purifiées et conservées sur gélose nutritive inclinée TSA (Tryptic Soja Agar) à +4°C. Avant leur utilisation elles sont activées par transfert sur bouillon nutritif.

2.1.3 Les souches des bactéries utilisées pour la préparation des filtrats

On a obtenu deux souches de *Bacillus megaterium* et *Pseudomonas fluorescens* de laboratoire de Microbiologie du Professeur Larous (Département de Microbiologie, Université de Sétif).

2.1.4 Matériel végétal

On a obtenus deux extraits en poudre de plante de genre *Carthamus careuleus* L. et *Ruta montana* L. de Laboratoire de Biochimie Appliqué à l'Université Ferhat Abbas Sétif de Professeur Arrar et Professeur Bouriche respectivement.

2.1.5 Différents géotypes de pois chiche

Dix variétés de pois chiche (Tab.2.) ont été utilisées à la moyenne de 30 graines par géotype.

Les géotypes ont été fournis par ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas)

Tableau 1 : les souches pathogènes utilisées

Souches pathogènes
Gram négatif
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Gram positif
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>

Tableau 2 : Liste des géotypes des pois chiches utilisés.

Numéro de variété	Géotype	Type	Origine
1	FLIP 97-185C	Kabuli	ICARDA
2	FLIP 97-56C	Kabuli	ICARDA
3	FLIP 97-111C	Kabuli	ICARDA
4	FLIP 98-168C	Kabuli	ICARDA
5	FLIP 97-21C	Kabuli	ICARDA
6	FLIP 85-45C	Kabuli	ICARDA
7	FLIP 97-220C	Kabuli	ICARDA
8	FLIP 97-23C	Kabuli	ICARDA
9	FLIP 98-167C	Kabuli	ICARDA
10	FLIP 82-150C	Kabuli	ICARDA

2.2 Milieux de culture

La souche d'*Ascochyta rabiei* a été cultivée sur quatre milieux (annexe) : Czapek Dox supplémenté par des cations, milieu Richard, l'extrait de pois chiche et un mélange de l'extrait de pois chiche et Czapek Dox, afin d'étudier l'effet de la composition de chaque milieu sur la croissance mycélienne, la sporulation et la production de solanapyrone A. On a utilisé la gélose dextrosée à la pomme de terre PDA(annexe), est un milieu de culture microbiologique courant produit à base d'infusion de pomme de terre et de dextrose; c'est le milieu de culture le plus largement utilisé pour cultiver des champignons et des bactéries qui attaquent les plantes vivantes ou la matière organique végétale en décomposition. Le bouillon nutritif (annexe) permet de cultiver la plupart des germes qui n'ont pas d'exigences particulières, il est utilisé pour cultiver les souches bactériennes pathogènes. Le milieu Czapek Dox liquide (annexe) a été utilisé pour la culture d'*Ascochyta rabiei* et pour le test de production de solanapyrone A, et le milieu de Malt Agar (annexe) dans son état solide pour cultiver le champignon.

2.3 Méthodologie de travail

2.3.1. La croissance fongiques et la production de toxine

A. rabiei a été cultivée en trois répétitions sur les quatre milieux en Erlenmeyer (30 ml/250 ml) conformément au protocole de Hamid et Strange (2000).

Ensuite dans des conditions stériles deux disques de diamètre de 8ml d'une culture du champignon de même âge de 14 jours sur Malt, ont été placés dans chaque milieu liquide (l'extrait de pois chiche, mélange de l'extrait de pois chiche et Czapek Dox, le milieu Czapek Dox supplémenté par les cations et le milieu Richard). Les quatre milieux sont incubés sans agitation pendant 10 jours à une température ambiante et à une luminosité de laboratoire. Ensuite on calcule le nombre de spores en utilisant la cellule mallassez pour chaque milieu et

chaque Erlène (Alam *et al.*, 1989).Après filtration à travers quatre couches de tissu de mousseline,les spores ont été retirées du filtrat par centrifugation à 3 000 g pendant 20 min. La centrifugation est répétée deux fois, la concentration de solanapyrone A a été calculée par la mesure de l'absorbance à 327nm, en utilisant le formule suivante :

$$C = (A_{327} * MW) / (\epsilon * L) * df/15$$

C = la concentration de solution g/l

A_{327} = l'absorbance à 327 nm

MW = le poids moléculaire de Solanapyrone A (302)

ϵ = coefficient d'extinction de Solanapyrone A à 327 nm (9400)

L = le passage de la lumière travers la cuvette (1cm)

df: le facteur de dilution souvent 50

15: la toxine a été concentrée 15 fois (30 ml de solution à 2ml de solvant organique).

2.3.2. L'effet de solanapyrone A sur les hypocotyles

une solution de solanapyrone A a été tester sur l'inhibition de l'élongation des hypocotyles des graines de pois chiche, la concentration initiale de solanapyrone A été de 20.4 $\mu\text{g/ml}$ (Zerroug *et al.*, 2007)

Pour étudier l'effet de solanapyrone A sur l'élongation des hypocotyles, les différents génotypes de pois chiche sont activés pour avoir une germination des racicules (1 cm de longueur), ensuite toutes les genres des graines ont été divisées en deux groupes et placées dans des boites Pétri (9 cm) contenant un papier filtre (Whatman No. 1; 70 mm diam.), a fin d'obtenir 20 boites ; 10 à traitées par solanapyrone A et les autres 10 comme témoins à traitées avec de l'eau distillée stériles. A fin de prévenir la sécheresse des graines une solution de 5ml de solanapyrone A a été distribuée pendant trois jours sur les dix boites avec une légère agitation pour que la toxine soit en contact avec l'ensemble des graines, ainsi il faut

ajouter 5ml encore de l'eau distillée pour les boites témoins. En globale toutes les boites testées a été traitées par 15 ml de toxine pendant trois jours et laissées dans le laboratoire et à l'obscurité.

La lecture se faite après 5 jours du premier traitement et le pourcentage d'inhibition a été calculée par la méthode de Haider *et al.*, (1986), comme suit :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \frac{\text{longueur de contrôle} - \text{longueur en teste}}{\text{longueur dans le contrôle}} \times 100$$

2.3.3 L'activité antibactérienne de solanapyrone A

Une solution de solanapyrone A a été utilisée pour le test antibactérien et la concentration initiale été de 45.73 µg/ml, une série de dilution double de solanapyrone A a été effectuer.

On a calculé la densité optique de chaque bactérie à 600 nm, et la suspension doit être suffisamment diluée de telle façon que la densité optique n'excède pas une valeur de l'ordre de 1. 100 µl de suspension bactérienne de chaque bactérie a été étalée sur des boites Pétri de gélose nutritive à raison de trois répétition pour chaque bactérie, en utilisant la méthode des disques sur gélose diffusé ; les disques ont été imbibées dans la série des dilutions 22.86 µg/ml, 11.43 µg/ml, 5.7 µg/ml, 2.8 µg/ml et 1.4 µg/ml de la concentration initiale de solanapyrone A (Remmal *et al.*, 1993), ensuite les boites ont été incubées à 37C° pendant 24 heures.

2.3.4 L'activité antifongique des extraits de plantes et filtrats de bactéries

D'abord La souche TK21 a été incubée initialement sur le milieu PDA pendant 14 jours à 20°C, six disques de 8mm de diamètre de la colonie fongique ont été ensemencées dans un tube de 10 ml d'eau distillée stérile; après agitation 1.8×10^7 spores/ml ont été obtenu. 1ml de la suspension sporulé d'*A.rabiei* a été dispersée sur les boites de milieu PDA et ont été laissés pour sécher à la température ambiante.

Deux extraits de plantes *Carthamus careuleus* L. et *Ruta montana* L. et deux filtrats de bactéries *Bacillus megaterium* et *Pseudomonas fluorescens* (Les deux souches sont incubées dans 10 ml de bouillon nutritif stérile pendant 72 heures à 30°C ; puis filtrées à travers un papier filtre stérile à porosité de 0,48µm, a fin d'obtenir deux filtrats des deux bactéries ; une série de dilution à été réalisée, 1/2, 1/4,1/8,1/16) ont été utilisés dans l'étude de l'activité antifongique, ce test a été effectuer sur un milieu solide gélosé de PDA. On a utilisé la technique des disques (figure 4) pour évaluer l'effet des extraits des plantes et les filtrats des bactéries sur la croissance mycélienne d'*A.rabiei*. Pour les extraits des plantes on a utilisé une concentration de 8mg /ml de *Carthamus Caeruleus* L. et 5 mg/ml de *Ruta montana* L. les deux extraits ont été dilués dans un ml d'eau distillée, et on a fait des séries des dilutions de : 1/2, 1/4,1/8,1/16. Chaque disque a été pipeté par 20 µl de chaque extrait de plante en utilisant un disque témoin de méthanol pour *Carthamus Caeruleus* L. et d'éthanol pour *Ruta montana*L. et pour le test des bactéries ; le disque a été imbibé par 30 µl du filtrat de chaque bactérie, les boîtes Pétri ont été incubées par la suite pendant 7jours à la température de laboratoire.

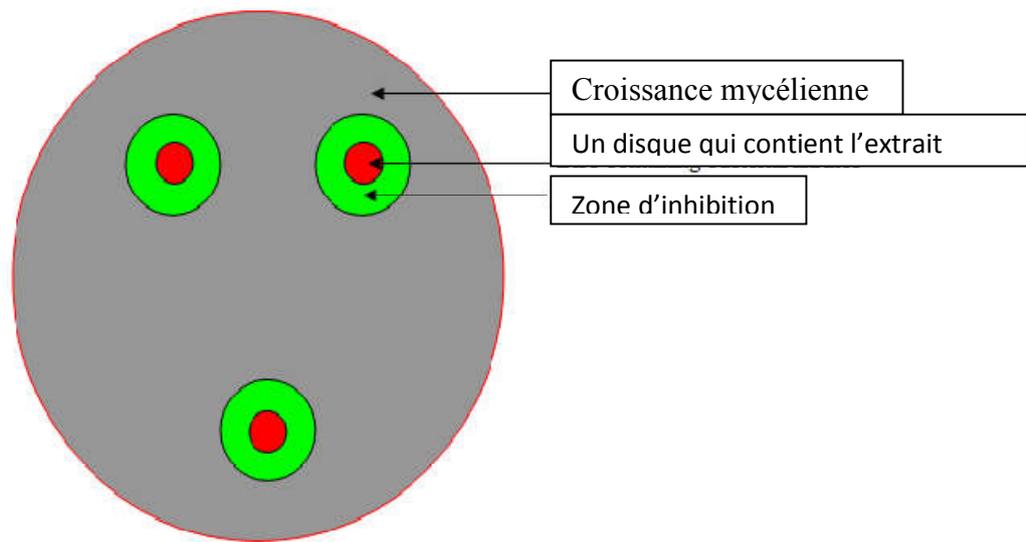


Figure 4 : La technique des disques

2.3.5 L'effet antagonisme de *Bacillus megaterium* et *Pseudomonas fluorescens* sur *A.rabiei*

On a utilisé la méthode de Vincent *et al.* , (1991) pour l'étude de chaque bactérie, en mettant un disque de 8mm de colonie âgée de 14 jours d'*A.rabiei* sur la moitié d'une boîte Pétri contenant le milieu gélose nutritive et à distance de 3cm de l'autre moitié de la boîte, après incubation à la température ambiante et jusqu'à ce que le disque de mycélium atteigne le diamètre 30mm, on a strié l'autre moitié de boîte avec 20 μ l de suspension bactérienne qui a été incubée pendant 48heures à 28°C.Au cours de cette expérimentation, trois répétitions ont été retenues pour chaque test. Les témoins sont représentés par des boites de Pétri contenant uniquement le champignon pathogène. L'ensemble des boites est placé à une température de laboratoire, et on a pris les résultats après un mois de croissance mycélienne.

Pour l'estimation de la croissance mycélienne, la technique utilisée est celle indiquée par Rapilly (1968) qui consiste à mesurer la croissance linéaire et diamétrale des colonies de pathogène. Les taux de croissance dans les deux essais ont été enregistrés en mesurant le diamètre des colonies selon Küçük et Kivanç (2003). Le pourcentage d'inhibition a été obtenu à l'aide de la formule :

$$I \% = [(C - T)] / C \times 100$$

Où T est la moyenne de la croissance d'*A. rabiei* du test et C est la moyenne de croissance du contrôle (Küçük et Kivanç, 2003).

2.3.6 L'effet des extraits végétaux et filtrats de bactéries sur la production de solanapyrone A

Ascochyta rabiei est inoculé sur milieu Malt solide pendant 14 jours afin d'obtenir des colonies qui vont être utilisées pour le test. Le taux de production de solanapyrone A a été testé par la préparation d'une série de dilutions des extraits naturels et des filtrats des bactéries dans le milieu Czapeck Dox liquide 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16. Sachant qu'on a utilisé les tubes à 10 ml de milieu Czapek Dox pour faire les dilutions, en partant de la même concentration initiale des extraits de *Carthamus* et *Ruta* et 10 ml de filtrat des bactéries utilisés dans le test antifongique, tandis que le témoin a été le milieu Czapek Dox. Ce test a été effectué sur une plaque de culture de 24 puits (2.5 ml/ puit) (Costar, Corning Inc., Etats-Unis), afin de répéter chaque test quatre fois, en suite les puits ont été inoculés par des disques de 8 mm de diamètre obtenu à partir de la culture fongique sur milieu solide. Après incubation à 20°C pendant 10 jours, la toxine a été calculée par la mesure de l'absorbance à 327 nm, en utilisant le calcul décrit précédemment.

RESULTATS

3.1. L'effet des milieux sur la production de solanapyrone A

La composition des milieux a un effet sur la croissance mycélienne d'*Ascochyta rabiei*, la sporulation et la production de toxine. On a obtenu les concentrations de solanapyrone A qui correspond à chaque milieu, avec le nombre de spore par ml et le poids sec de mycélium en gramme a fin de déterminer la corrélation entre tous ces paramètres (Tableau 3).

Le poids sec de mycélium est de 0.02g 0.41g 0.65 et 0.04g pour les milieux Extrait de pois chiche seul, Czapek Dox additionné par des cations, le mélange extrait de pois chiche et Czapek Dox et Rrichard respectivement.

Le nombre de spore est de $8,166 \times 10^7$ spore /ml, 2.3×10^7 spore /ml, 1.25×10^7 spore /ml, et 20×10^7 spore /ml pour les milieux Extrait de pois chiche seul, Czapek Dox additionné par des cations , le mélange extrait de pois chiche et Czapek Dox et Richard respectivement .

Les concentrations de solanapyrone A produite varie avec le milieu de culture ainsi on a enregistré $19 \mu\text{g/ml}$, $93.2 \mu\text{g/ml}$, $44 \mu\text{g/ml}$ et $20 \mu\text{g/ml}$ pour les milieux Extrait de pois chiche seul, Czapek Dox additionné par des cations , le mélange extrait de pois chiche et Czapek Dox et richard respectivement .

On a obtenu les concentrations de solanapyrone A qui correspond à chaque milieu, avec le nombre de spore par ml et le poids sec de mycélium en gramme a fin de déterminer la corrélation entre tous ces paramètres avec la production de toxine (Tableau 3).

Tableau 3: le nombre de spore, poids sec de mycélium et concentration de solanapyrone A pour chaque milieu

milieux	Nombre de spore Spore×10⁷ /ml	Le poids sec de mycélium(g)	Concentration de solanapyrone A (µg /ml)
Extrait de pois chiche	8,166 ±1,49	0,02±0	19±3,55
czapek dox+cation	2,3±0,45	0,41±0,01	93 .2±5,87
czapek dox+ extrait de pois	1,25±0,64	0,65±0,02	44±7,77
Richard	0,5±0,16	0,04±0,01	20±4,04

3.2. Effet inhibiteur de solanapyrone A sur l'élongation des hypocotyles

Les résultats ont montré que solanapyrone A inhibe l'élongation d'hypocotyles avec des pourcentages d'inhibition différents selon la variété testée. Ce pourcentage d'inhibition varie entre 39.1 % pour la variété FLIP 97-220C et 59.84 % pour la variété FLIP 85-45C (tableau 4). L'analyse statistique a donnée une variance significative ($p < 0.05$) entre les variétés testées ; cette variance est schématisée (Fig.5).

Tableau 4 : le pourcentage d'inhibition de solanapyrone A sur les différentes variétés de pois chiche

Les variétés	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10
Pourcentage d'inhibition%	58.1	43.66	53.81	49.69	56.85	59.84	39.1	55.51	46.83	42.59
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	1.26	2.92	1.94	1.24	3.31	3.7	0.61	2.9	1.56	1.7

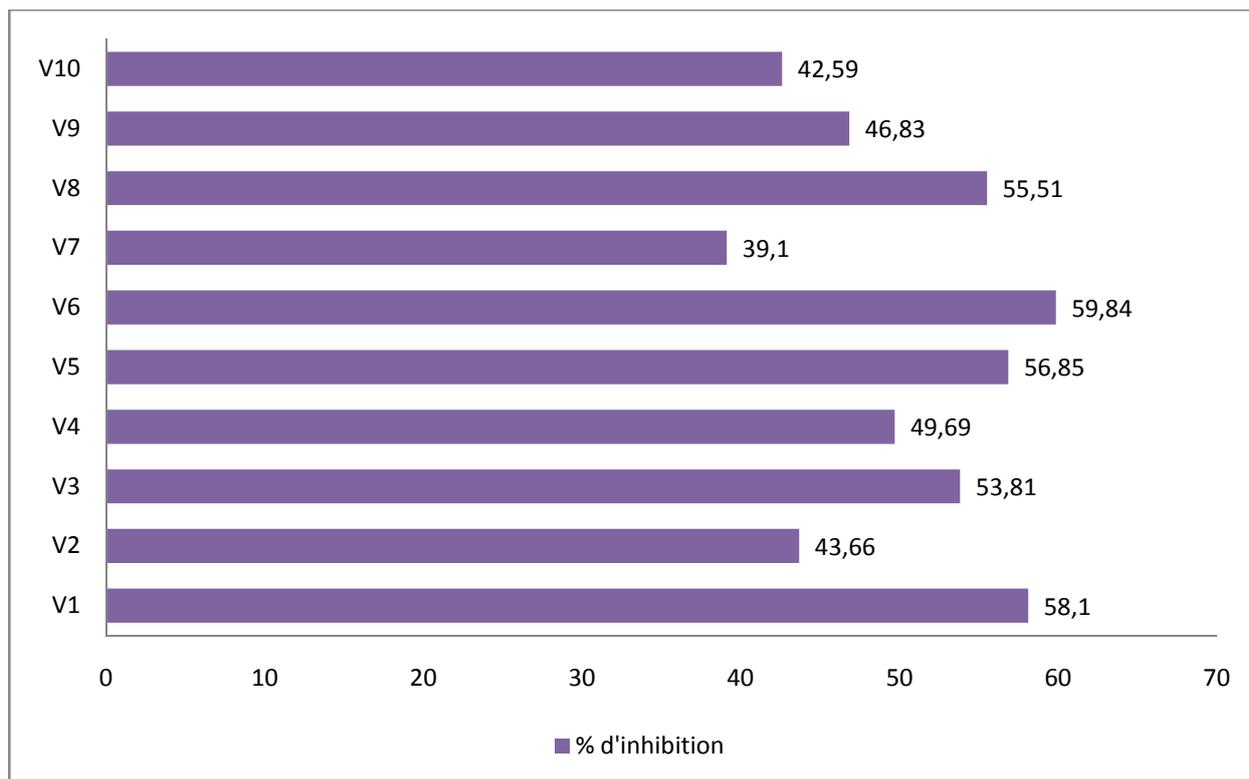


Figure 5 : la variation de pourcentage d'inhibition d'hypocotyle des différentes variétés de pois chiche par solanapyrone A.

3.3. Activité antibactérienne de solanapyrone A

La solanapyrone A a un effet antibactérien contre certaines bactéries pathogènes, cet effet est traduit par une zone d'inhibition pour chaque bactérie, par contre il ne présente aucun effet sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (tableau 5). Selon les dilutions utilisées on a calculé la CMI pour chaque bactérie (tableau 6) (fig. 6). On peut selon le tableau 3.4 donner un ordre croissant des bactéries résistantes : *Escherichia coli* ATCC 25922 > *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 > *Proteus vulgaris* > *Enterobacter cloacae* > *Acinetobacter baumannii* ; et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 est une souche qui présente une résistance complète à solanapyrone A. L'étude statistique présente une différence significative entre les concentrations minimales inhibitrices de solanapyrone A pour chaque bactérie ($P < 0.05$).

Tableau 5 : la variation des diamètres d'inhibition en (mm) pour chaque bactérie pathogène de solanapyrone A.

Les bactéries pathogènes	Diamètres d'inhibition en (mm)					
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15.33 ± 0.57	10.66 ± 0.57	–	–	–	–
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8.5 ± 0.5	–	–	–	–	–
<i>Enterobacter cloacae</i>	10.66 ± 0.57	5.83 ± 1.04	4.83 ± 0.28	–	–	–
<i>Acinetobacter baumannii</i>	13.66 ± 1.04	9.16 ± 1.64	9.5 ± 0.5	7.83 ± 0.76	6.83 ± 0.76	–
<i>Proteus vulgaris</i>	12.83 ± 0.76	7.72 ± 0.25	–	–	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	–	–	–	–	–	–

- Absence d'effet inhibiteur.

Tableau 6 : Les différentes concentrations minimale de solanapyrone A, inhibitrices des bactéries pathogènes

	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 27853
CMI $\mu\text{g/ml}$	22.86	45.73	11.43	2.9	22.86

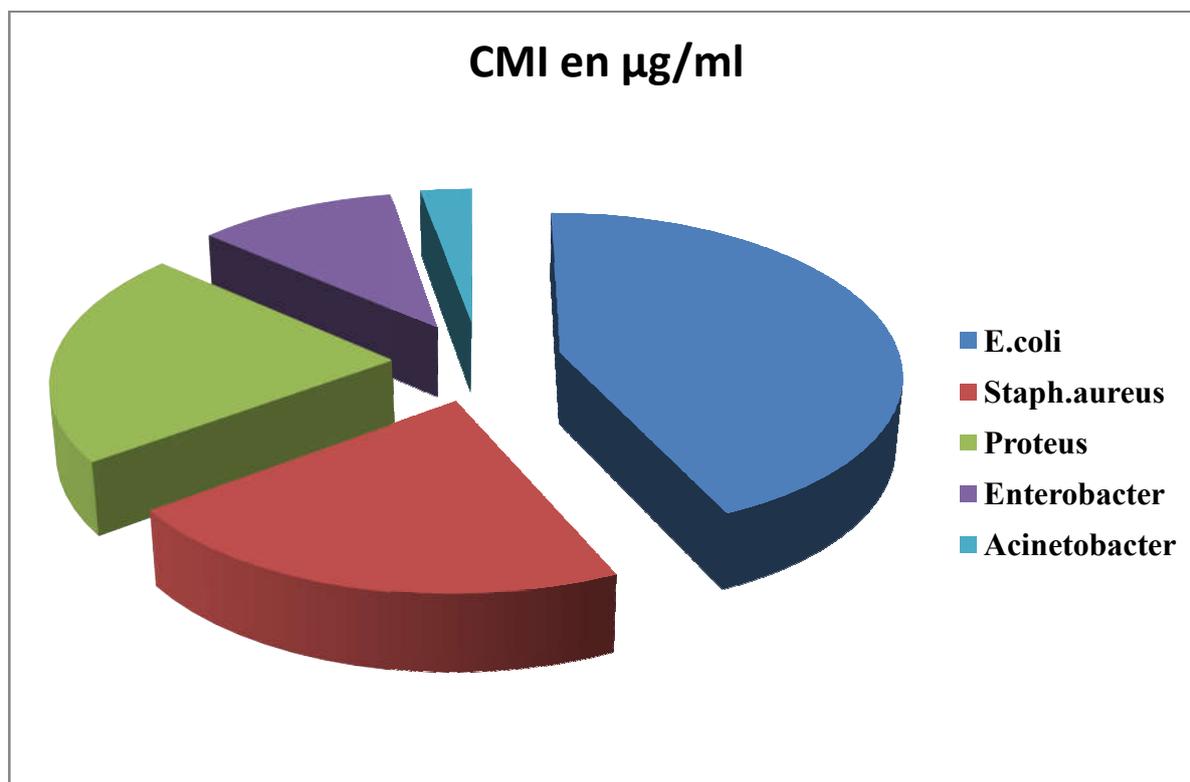


Figure 6 : la CMI en $\mu\text{g/ml}$ de solanapyrone pour chaque bactérie qui révèle sa résistance.

3.4. L'effet des extraits de plantes sur la croissance mycélienne

Les deux espèces *Carthamus Caeruleus L.* et *Ruta montanaL.* ont été testées pour leur activité inhibitrice vis-à-vis de la croissance mycélienne d'*A.rabiei*. Les deux espèces ont montré une activité inhibitrice sur la croissance de champignons à différentes concentrations. Les extraits ont abouti à l'apparition d'un halo d'inhibition qui se traduit par un diamètre d'inhibition sachant que la concentration minimale inhibitrice pour *Carthamus Caeruleus L.* a été 2 mg/ml correspond à la dilution 1 /4et 0.625 mg/ml pour *Ruta montanaL.* correspond à la dilution 1 /8 (Table.8). Selon les résultats obtenus l'extrait de *Ruta montanaL.* a montré une forte inhibition de croissance mycélienne (11.33mm) avec une concentration de 5mg/ml et l'extrait *Carthamus Caeruleus L.*a montré une faible inhibition de croissance mycélienne (8.5mm)avec une concentration de 8mg/ml (Fig. 7)

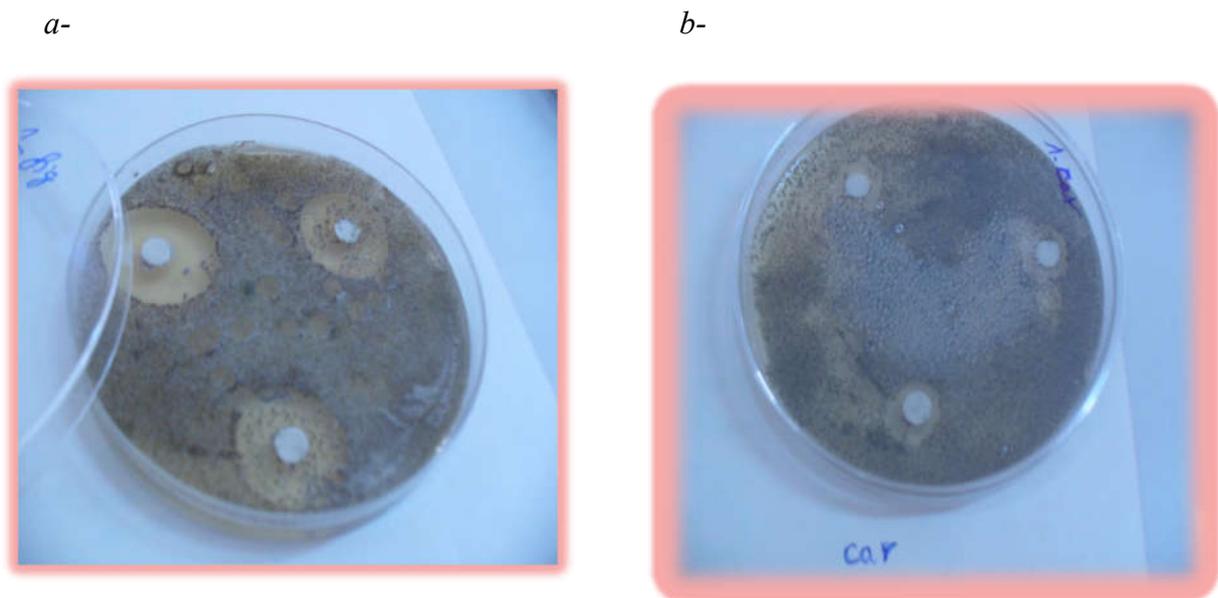


Figure 7 : L'effet de *Ruta montanaL.* (a) et *Carthamus Caeruleus L.* (b) sur la croissance d'*A.rabiei*.

3.5 L'effet antagoniste des bactéries sur la croissance fongique *in vitro*

Les deux bactéries *Bacillus megaterium* et *Pseudomonas fluorescens* ont montré un effet antagoniste sur la croissance d'*A.rabiei* (fig. 8) et l'effet sur la croissance radiale de champignon le plus intense a été celui de *Pseudomonas fluorescens* qui a montré un pourcentage d'inhibition de 50.31% par rapport à 43.17% (table.7).

Tableau 7 : effet des filtrats des bactéries sur la croissance linéaire en (cm) d'*A.rabiei* après un mois.

	La croissance linéaire (cm) d' <i>Ascochyta rabiei</i>	% d'inhibition
témoin	4.75±0.50	0%
<i>Bacillus megaterium</i>	2.7±0.51	43.175%
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2.36±0.12	50.315%



(a)



(b)



(c)

Figure 8 : L'antagonisme de *Bacillus megaterium* et *pseudomonas fluorescens* sur le champignon *Ascochyta rabiei*.

(a) Le témoin, le champignon seul.

(b) L'antagonisme de *Bacillus megaterium* sur *Ascochyta rabiei*.

(c) L'antagonisme de *Pseudomonas fluorescens* sur *Ascochyta rabiei*.

3.6 Effets des filtrats de *Bacillus megaterium* et *Pseudomonas fluorescens*. sur la croissance mycélienne

Les résultats ont montré que *B. megaterium* et *P. fluorescens* ont inhibé la croissance d'*A. rabiei*. Diverses zones d'inhibition ont été observées selon la dilution du filtrat brut et la concentration minimale inhibitrice (CMI) de *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus megaterium* a été 1/8 et 1/4 du filtrat brut respectivement (tableau 8). On a remarqué que le diamètre de la zone d'inhibition induite par le filtrat brut de *Pseudomonas fluorescens* sur la croissance fongique été plus important que celui manifesté par le filtrat de *Bacillus megaterium* : les zones étaient respectivement de 27 mm, et 17 mm (fig.9). En plus il y a un noircissement sur le contour des zones d'inhibition; ce phénomène nous a intrigué et pour cette raison on a pris deux prélèvements; l'un de cette partie noire et l'autre sur une partie plus loin de cette zone d'inhibition et les résultats ont montré deux formes différentes de champignons : sexué (*Didymilla rabiei*) et asexué (*Ascochyta rabiei*) (fig.10)

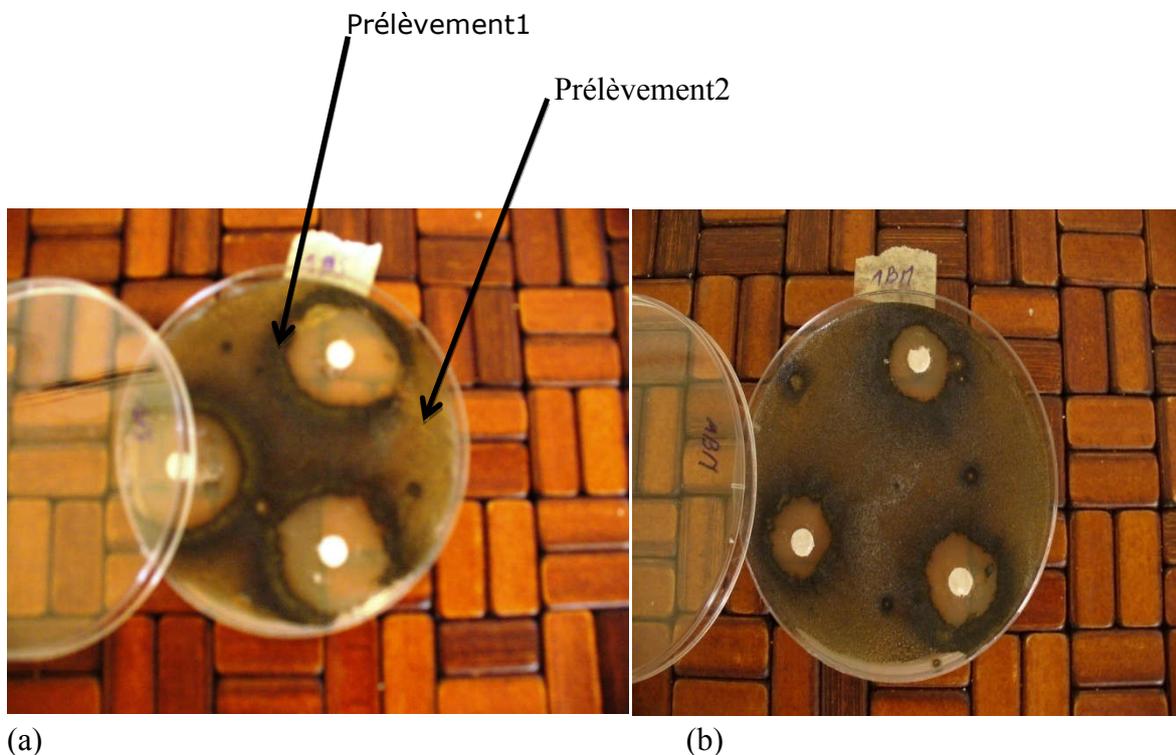


Figure 9 : (a) Les zones d'inhibition de filtrat brut de *pseudomonas fluorescens*.
(b) Les zones d'inhibition de filtrat brut de *bacillus megaterium*.

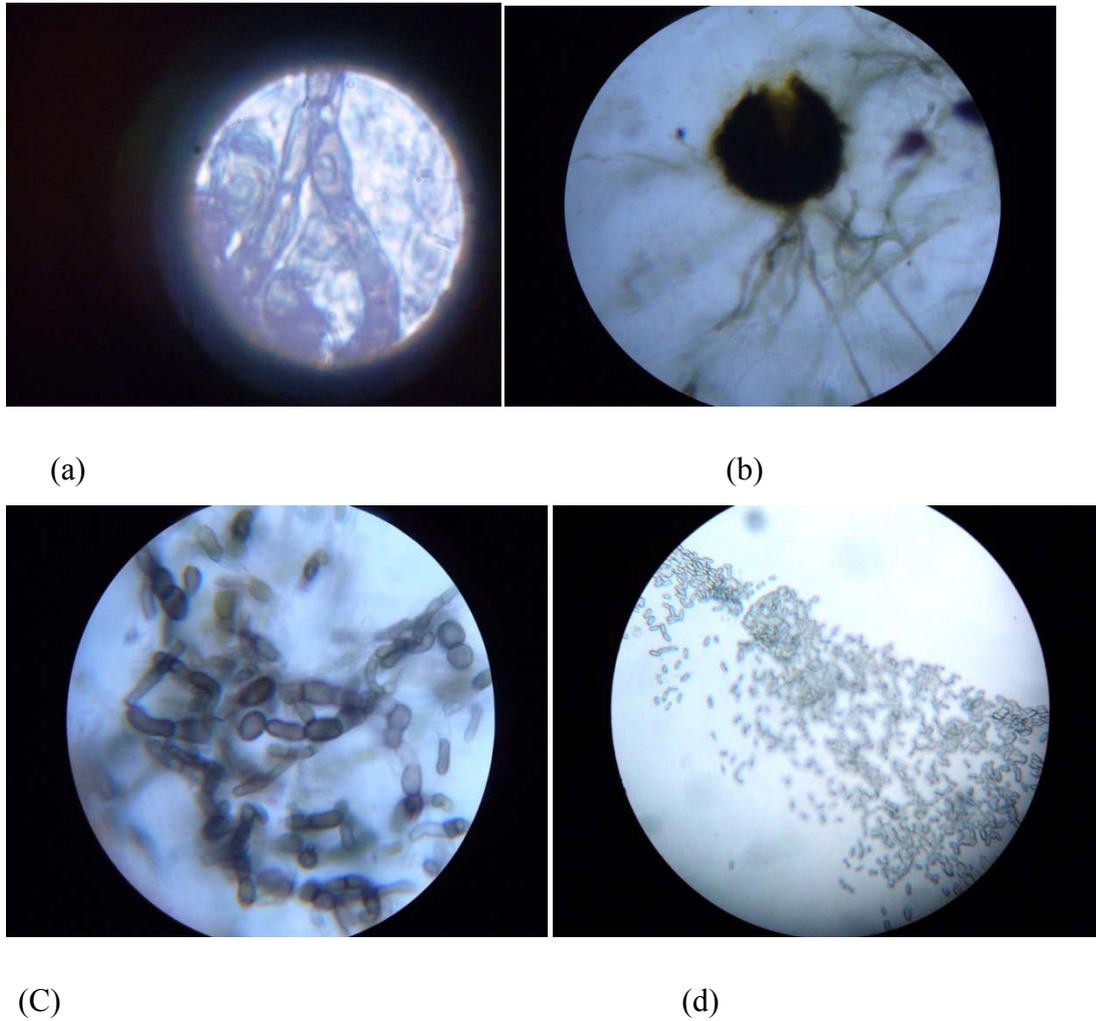


Figure 10 :

(a) et (c) des images de microscope optique de premier prélèvement qui présente la forme *Didymilla rabiei*.

(b) et (d) des images proviennent du second prélèvement qui présente la forme *Ascochyta rabiei*.

(a) Des asques et pseudothèces mature ; (b) picnidiophore ;
(c) des ascospores ; (d) des conidies

3.7 L'effet des extraits de plantes et filtrats de bactéries sur la production de solanapyrone A

Les deux extraits de plantes et de filtrats bactériens présentent un effet remarquable sur la production de solanapyrone A à différentes dilutions. Sachant que la concentration de solanapyrone A dans le milieu témoin Czapek Dox était de 82.89 µg/ml.

on constate une diminution de la production de solanapyrone A à une concentration inférieure ou égale à la CMI de chacun des extraits des plantes ou filtrats des bactéries, bien que la croissance mycélienne a été moins inhibée ou développée, tandis qu'aux concentrations supérieures à celle de la CMI d'extrait ou de filtrat, on a observé une activation de la production de solanapyrone A où il y a normalement une inhibition de la croissance fongique (tableau 8). La relation de production de toxine et la concentration d'extrait de plante ou filtrat de bactérie avec le diamètre d'inhibition d'*A.rabiei* (croissance fongique) a été illustrée sur des courbes pour mieux comprendre ce phénomène (fig.11).

Dans tous les cas illustrés l'augmentation de production de toxine coïncide avec un taux de croissance fongique faible, et on peut organiser l'ordre selon l'importance de l'influence des extraits naturels et filtrats des bactéries sur la production de solanapyrone A comme suit : *Bacillus megaterium*>*Pseudomonas fluorescens*>*Ruta montana*L. >*Carthamus Caeruleus* L.

Tableau 8 : Les diamètres d'inhibition et la concentration de solanapyrone A de chaque extrait et filtrats à différentes dilutions.

		1	1/2	1/4	1/8	1/16
<i>Carthamus Caeruleus L.</i>	Diamètre d'inhibition (mm)	8.5±0.5	7.83±0.28	5.16±0.28	0	0
<i>Carthamus Caeruleus L</i>	Concentration de solanapyrone A (µg /ml)	113.16±20.73	106.12±15.27	82.40±9.15	64.76±21.5 3	58.84±6.93
<i>Ruta montanaL.</i>	Diamètre d'inhibition (mm)	11.33±0.76	11±0.5	9.83±0.28	8.33±0.28	0
<i>Ruta montanaL.</i>	Concentration de solanapyrone A (µg /ml)	285.52±12.73	235.62±11.7	140.25±6.89	78.41±3.9	64.18±8.78
<i>Bacillus megaterium</i>	Diamètre d'inhibition (mm)	17.66±1.15	12.5±1.32	7.66±2.51	0	0
<i>Bacillus megaterium</i>	Concentration de solanapyrone A (µg /ml)	156.96±5.92	83.19±8.75	44.78±3.5	40.44±1.37	38.96±4.15
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Diamètre d'inhibition (mm)	27±0.86	21.33±1.15	10.66±1.15	7.66±1.52	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Concentration de solanapyrone A (µg /ml)	144.19±28.03	98.09±11.79	79.24±10.51	47.57±1.29	42.13±2.21

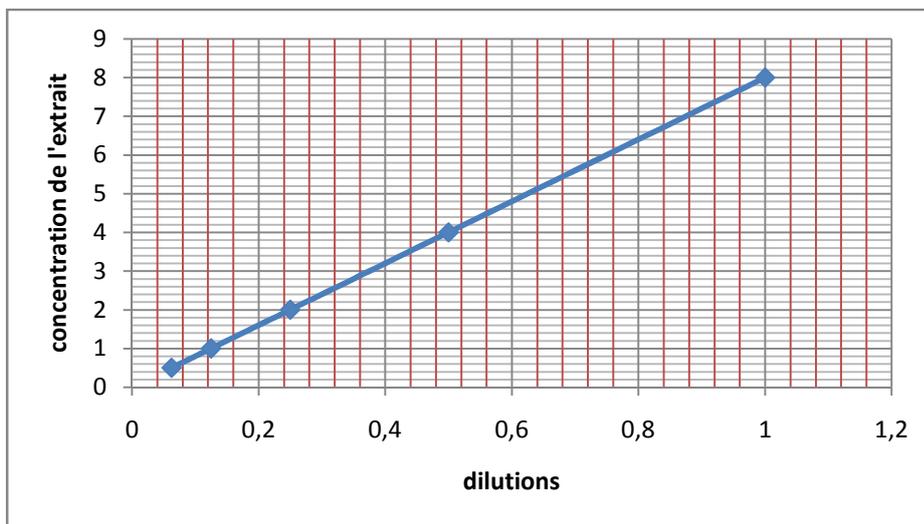
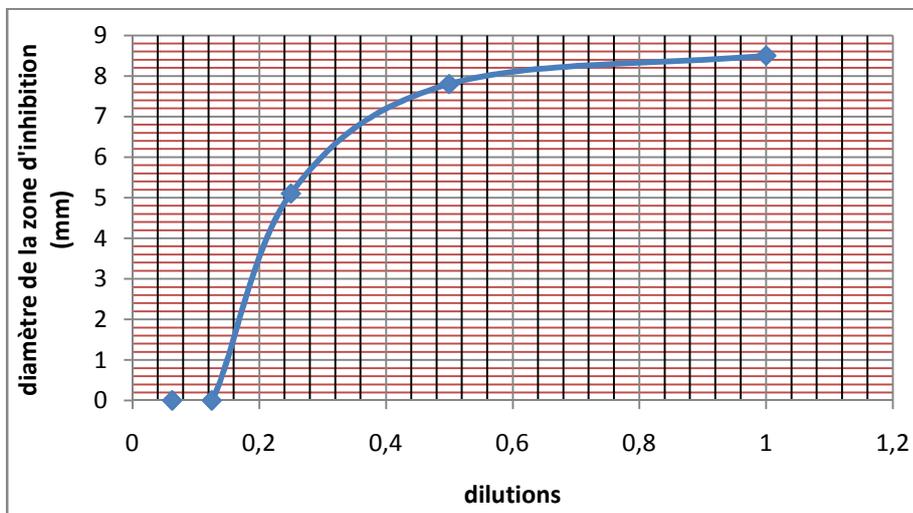
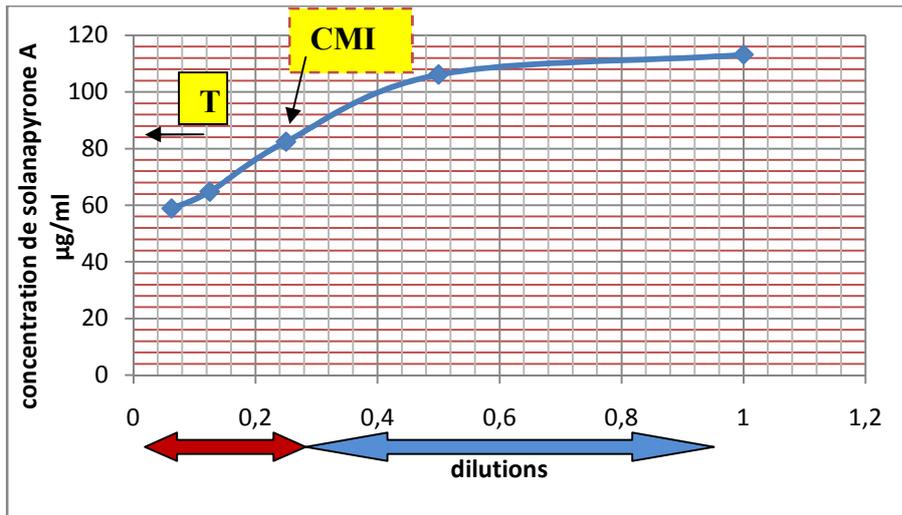


Figure 11a : Variations des concentrations de solanapyrone A par rapport au taux de croissance d'*A.rabiei* .Noter qu'en présence de forte concentration de l'extrait *Carthamus Caeruleus L.*, le taux de croissance est faible, ce qui coïncide avec une forte production de solanapyrone A

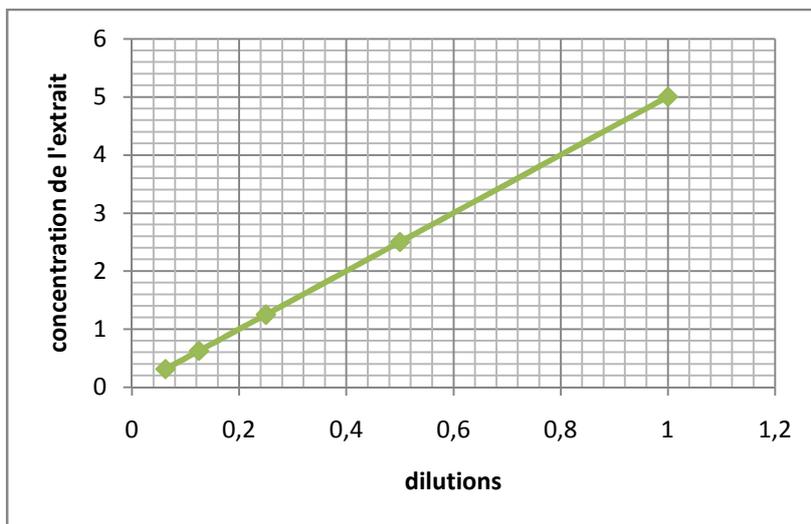
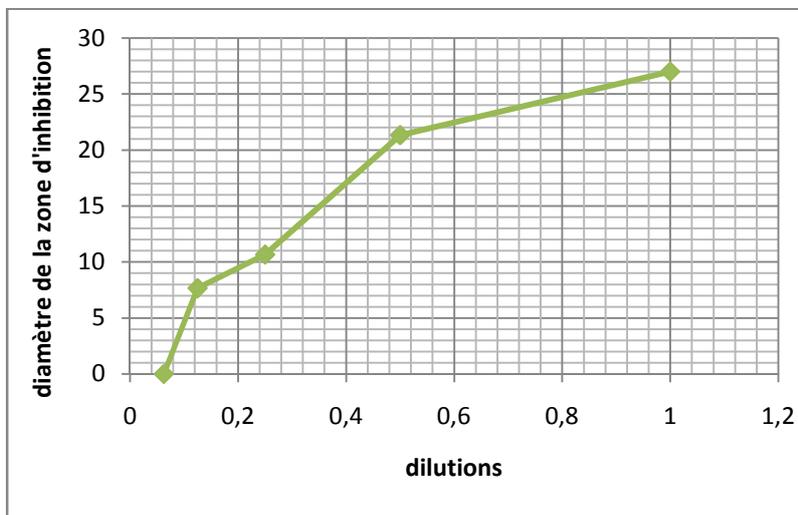
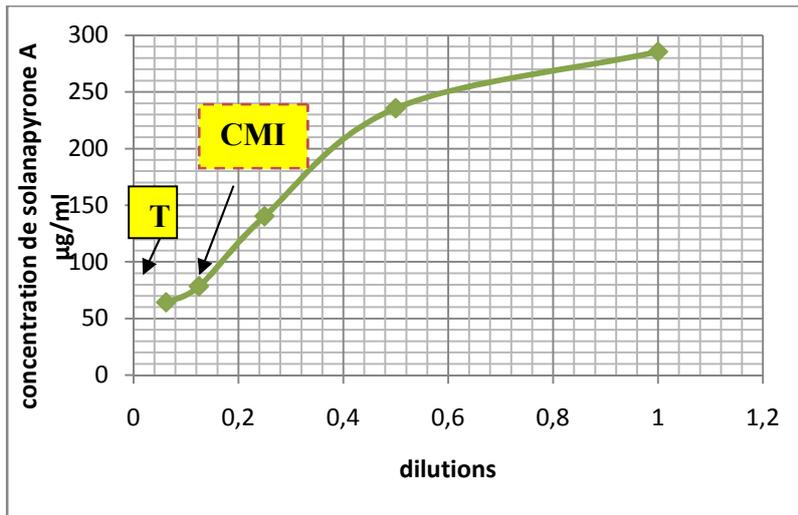


Figure 11b : Variations des concentrations de solanapyrone A par rapport au taux de croissance d'*A.rabiei*. Noter qu'en présence de forte concentration de l'extrait *Ruta montana*L., le taux de croissance est faible, ce qui coïncide avec une forte production de solanapyrone A.

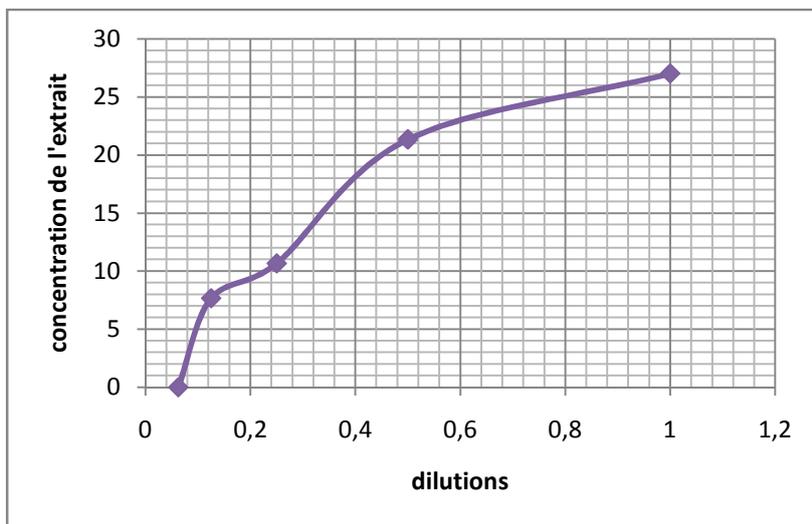
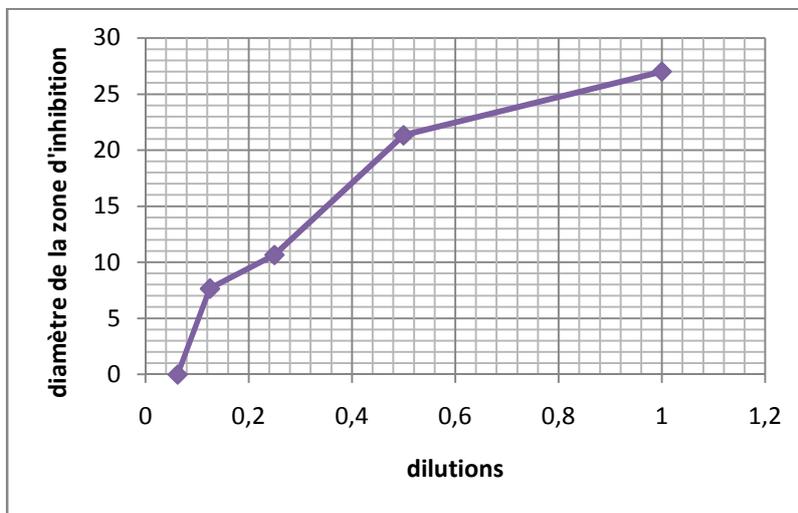
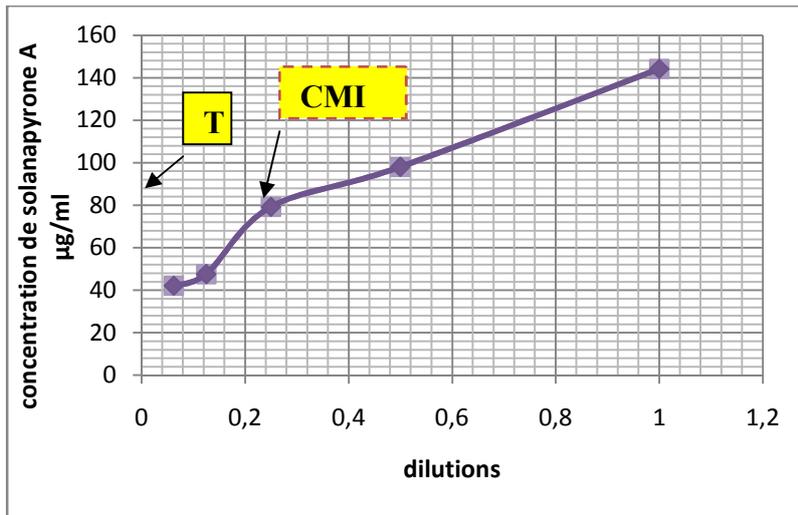


Figure 11C : Variations des concentrations de solanapyrone A par rapport au taux de croissance d'*A.rabiei* .Noter qu'en présence de forte concentration de filtrat brut de *Bacillus megaterium*, le taux de croissance est faible, ce qui coïncide avec une forte production de solanapyrone A.

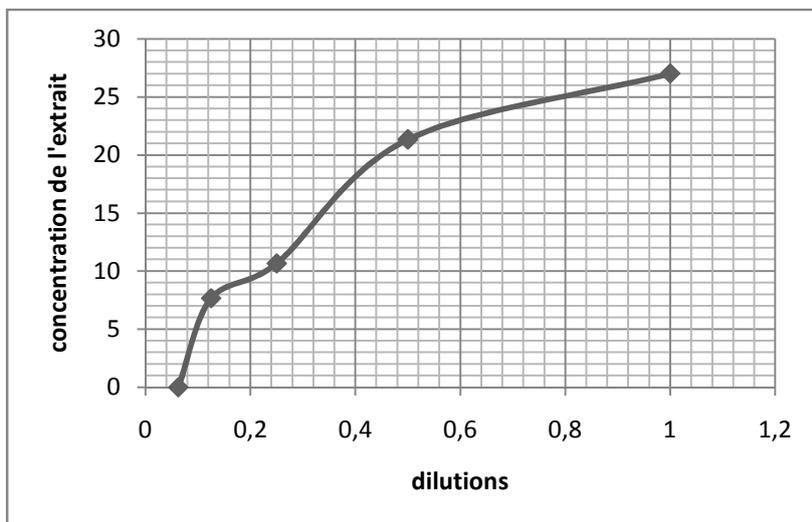
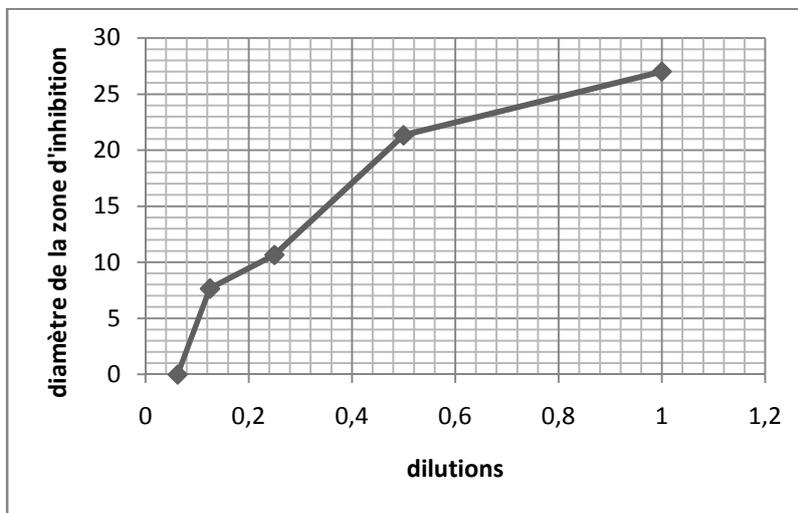
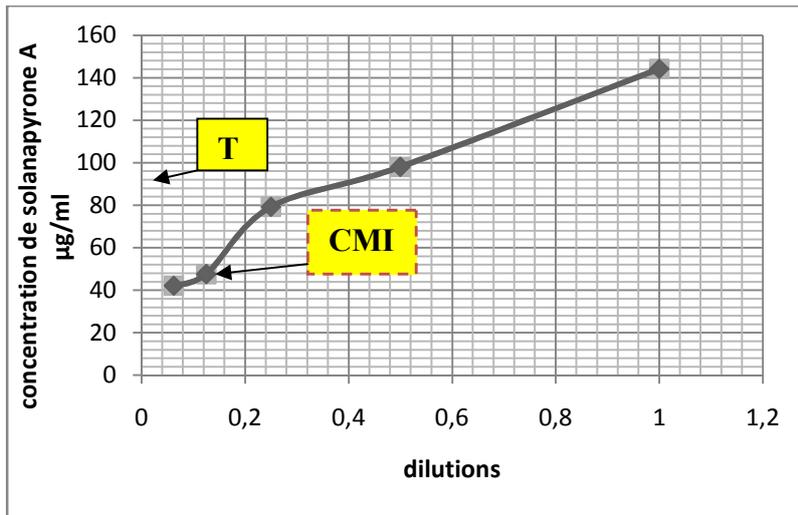


Figure 11d : Variations des concentrations de solanapyrone A par rapport au taux de croissance d'*A.rabiei* .Noter qu'en présence de forte concentration de filtrat brut de *Pseudomonas fluorescens*, le taux de croissance est faible, ce qui coïncide avec une forte production de solanapyrone A.

DISCUSSION

1. Étude comparative de la concentration de solanapyrone A des milieux

La composition du milieu influe sur la production de solanapyrone A ainsi que la croissance fongique et la sporulation. Il y a une production de solanapyrone A dans les quatre milieux, l'extrait de pois chiche seul, Czapek Dox supplémenté par les cations Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , et Mn^{2+} , l'extrait de pois chiche additionné par Czapek Dox et le milieu Richard mais à des concentrations différentes et on a une meilleure production de solanapyrone A sur le milieu Czapek Dox. Les concentrations de solanapyrone A sont respectivement $19\mu g/ml$; $93\mu g/ml$; $44\mu g/ml$ et $20\mu g/ml$; ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Chen et Strange (1991), ils ont trouvé que la production des phytotoxines par *A.rabiei* est dépend des éléments nutritifs; et ils ont trouvé aussi que les toxines solanapyrone A, B et C sont produites seulement dans les milieux artificiels supplémentés par l'extrait liquide de pois chiche (Chen et Strange, 1991; Höhl *et al.*, 1991; Kaur, 1995), ceci est en relation avec nos résultats qui ont révélés la diminution de la concentration de solanapyrone A de $44\mu g/ml$ dans le milieu artificiel Czapek Dox supplémenté par l'extrait de pois chiche à $19\mu g/ml$ dans le milieu de l'extrait de pois chiche seul. La concentration la plus élevée de solanapyrone a été trouvée dans le milieu Czapek Dox supplémentée par les cations et elle est de $93\mu g/ml$. Dans une étude par Chen et Strange (1991) pour définir le milieu de croissance des champignons dans lequel solanapyrones ont été optimale produites, l'effet de l'extrait aqueux de graines de pois chiche pour induire la synthèse des composés phytotoxiques pourrait être complètement remplacé par les sels des cations divalents métal comme le zinc, calcium, cuivre et de cobalt de manganèse. on a trouvé que la concentration de solanapyrone A est de $44\mu g/ml$ dans le mélange Czapek Dox et extrait de pois chiche et donc presque la moitié de la concentration de

solanapyrone A dans le milieu Czapek Dox supplémenté par les cations qui a été 93 µg/ml; ce résultat ne contredit pas avec celui de Chen et Strange (1991) puisque ils ont trouvé que la concentration de solanapyrone A est de 0,10 Mm dans le mélange extrait de pois chiche et Czapek Dox; donc la moitié de celle de Czapek Dox supplémenté par des cations (0,23mM) malgré que le poids sec de mycélium dans notre expérience soit presque le même dans le mélange Czapek Dox et pois chiche que dans le milieu Czapek Dox et cations, on a 0,41g pour le milieu Czapek Dox plus les cations et 0,65g pour le mélange Czapek Dox et pois chiche. Dans leur expérience ils ont trouvé que le poids sec de mycélium est de 0,43 g dans le milieu mélange Czapek Dox et l'extrait de pois chiche est de 0,45g dans le milieu Czapek Dox enrichi de cations. En outre il y a une corrélation positive entre le nombre de spore et la concentration de solanapyrone dans les deux milieux, on a 2.3×10^7 spores/ml dans le milieu Czapek Dox additionné de cations qui correspondent à une concentration de solanapyrone A de 93µg ml /, le nombre de spore est presque le double de nombre de spores dans le milieu mélange de Czapek Dox et pois chiche (1.25×10^7 spores/ml) qui correspond aussi à le double de la concentration de solanapyrone A (44 µg/ ml) ; cela signifie aussi que la sporulation d'*A.rabiei* a été affectée par la composition du milieu et elle affecte à son tour la production de solanapyrone A . La production de solanapyrones est maximal lorsqu'elle se produit après le début de la sporulation et les solanapyrones sont aussi présents dans le fluide de germination de spores d'*A. rabiei*, indiquant un rôle possible dans le développement précoce de la maladie (Jayakumar *et al.*, 2005) . En plus l'exigence de pois chiche par *A.rabiei* pour la production des phytotoxines à été signalée précédemment (Alam *et al.*, 1989). Les ions métalliques sont importants aussi dans le métabolisme primaire des champignons ; le zinc, par exemple, est une composante essentielle de plus de 200 enzymes, y compris celles impliquées dans la répllication et la transcription de l'ADN, ainsi que la traduction de l'ARNm (Vallee, 1983), le Manganèse joue également un rôle dans de nombreuses enzymes importants

telles que superoxide dismutase, catalase et ADN polymérase (Ferrin *et al.*, 1986 ; Bayer *et al.*, 1990), et le calcium est le second messager chez les plantes supérieures et les champignons (Moreau, 1987) ; en outre, la production des métabolites secondaires comme les mycotoxines ou les antibiotiques est dépendante de la disponibilité de certains cations (Weinberg, 1970 ; Shaw, 1991. Smith *et Moss*, 1985). Par exemple, le zinc est requis pour la synthèse de versicolorine par *Aspergillus parasiticus* en culture liquide (Niehaus et Jiang, 1989). Le cation le plus important semble être le zinc, puisque son omission de milieu non seulement affecte la production de solanapyrone A mais aussi il y a une diminution de la croissance du champignon (chen et strange, 1991) , puisque le zinc est un important cofacteur dans la synthèse des antibiotiques et des enzymes fongiques (Kalyanasundaram *et al.*, 1955 ; Weinberg, 1970 ; White *et al.*, 1971 ; jackson *et al.*, 1989) . Le Manganèse réduit la production de solanapyrone A mais il n'affecte pas la croissance mycélienne (chen et strange, 1991) , il est aussi important dans la biosynthèse de quelque métabolites secondaires par exemple la formation de phytotoxine naphthazarines par *Fusarium martii* var. *pisi* dépend sur la présence de Manganèse dans le milieu comme le cation de Zinc (kern, 1972), l'enlèvement de Calcium, Cobalt ou Cuivre réduit la production de solanapyrone mais pas la croissance de champignon (chen et strange,1991) ; ceci suggère que ces cations sont requis pour les métabolismes secondaires impliquée dans la synthèse de solanapyrones; on ne sait pas comment ces cations métalliques influent sur la formation de solanapyrones (chen et strange, 1991). Mais comment peut on expliquer la diminution de la concentration de solanapyrone A dans le mélange Czapek Dox et pois chiche alors que normalement il contient les mêmes concentrations de cations et surtout le Zinc qui réagi comme un cofacteur pour les enzymes fongiques pour produire la toxine et qui entre dans sa composition, par rapport à l'autre milieu Czapek Dox et cations qui a présenté le taux double de la concentration de solanapyrone A ? la réponse est expliquer par le mécanisme général de détoxification

xénobiotique par les plantes est le système de glutathion/glutathion-S-transférase et certaines recherches ont obtenus que la détoxification de solanapyrone A par le pois chiche est un moyen de défense (Hamid et Strange, 2000). Bien que, *A. rabiei* ait produit des solanapyrones A, B et C en culture, seulement solanapyrone C a été affirmé avoir été trouvé dans les plantes infectées (Alam *et al.*, 1989) les autres chercheurs n'ont trouvé aucun des trois composés (Höhl *et al.*, 1991). Les autres mécanismes sont plus précise, les plantes supérieures possédant des enzymes spécifiques capables d'inactiver les toxines fongiques ou bactériennes (Kreuz *et al.*, 1996). Colrat *et al.*, (1999); ont trouvé que la légumineuse, le haricot mungo, s'est avéré être une excellente source d'enzymes qui accomplit cette réaction et réduit également une variété d'autres aldéhydes aromatiques. Il était donc tout à fait possible que le pois chiche qui est une autre légumineuse qui possède la même enzyme permettrait de réduire la solanapyrone aldéhydique en alcool moins toxique qui est solanapyrone B (Bahti et Strange, 2004). Donc l'absence de solanapyrone A chez les plantes de pois chiche infectées par *Ascochyta rabiei* a été étudiée, et nous pouvons expliquer nos résultats. Et même chose a été passé dans le milieu d'extrait de pois chiche, on remarque un nombre de spores élevé de $8,166 \times 10^7$ spore/ml qui conduit normalement à un taux de sporulation élevée et donc par la suite une production de solanapyrone A élevée, mais dans cette expérience on a trouvé que la concentration de solanapyrone A est basse : elle est de $19 \mu\text{g/ml}$. Ces données montrent que solanapyrone A est un composé labile, réagit avec des protéines, éventuellement en se liant à eux et avec des composés de faible poids moléculaire. Il n'est pas étonnant donc qu'il n'ait été ni récupéré dans les plantes infectées, où sa réactivité est susceptible d'être la raison de sa toxicité. Tandis que le milieu Richard apparaît un milieu défavorable pour la survie d'*A. rabiei* puisqu'on observe une diminution de taux de tous les paramètres, on a 0.5×10^7 spores /ml, le poids sec de mycélium est de 0.04 g et la concentration de solanapyrone A est de $20 \mu\text{g/ml}$. Sachant que la production des métabolites secondaires commence généralement à la fin de la croissance,

en entrant à la phase stationnaire (Bu'Lock, 1961). Cette phase se produit lorsque les nutriments qui alimentaient une croissance exponentielle se sont raréfiés, ou que les conditions de culture se sont détériorées. Dans les deux cas, la culture est entrée dans une période de stress physiologique (Pan *et al.*, 1996a,b).

2. L'inhibition des hypocotyles de pois chiche par solanapyrone A

il semble possible que les toxines solanapyrone jouent un rôle important dans la perte de viabilité du pois chiche infectés, la mortalité des semences et des plantes (Hamid et Strange, 2000 ; Bahti et Strange, 2004 ; Ahmad *et al.*, 2006). Comme tous les isolats d'*A. rabiei* produisent invariablement les toxines solanapyrones, il était d'intérêt afin de déterminer si les toxines ont pu compromettre la germination des graines et les premiers stades de développement des semis. Dans notre expérience l'élongation des hypocotyles était inhibée chez plusieurs cultivars utilisés. Il serait intéressant de déterminer l'étendue de la variation de sensibilité entre les cultivars de pois chiches à solanapyrone A et déterminer sa relation à la susceptibilité des plantes entières à la maladie. Cette variation pourrait résulter d'une différence physiologique entre les graines. L'inhibition pourrait être due à l'inactivation des enzymes nécessaires à leur germination par solanapyrone A. En outre l'inhibition des hypocotyles par solanapyrone A pourrait servir comme un écran préliminaire pour la susceptibilité des génotypes de pois chiche à l'antracnose. Dans notre étude on a trouvé que le génotype le plus résistant à l'inhibition de solanaopyrone A à l'élongation des hypocotyles a été FLIP 97-220C ; la même variété a été trouvé très résistante sur le champ à la maladie d'antracnose causé par *A.rabiei* dans une étude de Farshidet *al.* ,(2008), cette résultat indique que peut être la résistance des variétés à la maladie d'*Ascochyta rabiei* résulte automatiquement à la résistance de sa toxine solanapyrone A, cette étude ouvre un grand portail sur la lutte biologique de la maladie en utilisant les gènes et les protéines produites par les cultivars résistants reste à découvrir le mécanisme exact de cette résistance. Une résistance

complète à *A. rabiei* n'a pas été trouvée chez le pois chiche. En plus, Chez les végétaux supérieurs, la division cellulaire a lieu au niveau de régions spécialisées, les méristèmes. Le méristème primaire de la racine est histogène dans un plan radial, l'activité de division organise des couches cellulaires concentriques, Alors que l'activité de division produit des cellules indifférenciées (Perrot-Rechenmann, 2010). La cellule initiale se divise et génère une nouvelle cellule initiale et une cellule fille qui subira un petit nombre de divisions, avant de se différencier (van den Berg *et al.*, 1997). La réplication d'ADN c'est le processus de doublement du contenu en ADN d'une cellule mère par mitose afin de transmettre l'ensemble de son potentiel génétique aux 2 cellules filles. Le cycle cellulaire chez les plantes se déroule en 4 étapes successives qui sont chacune sous le contrôle des enzymes. Le passage de la phase G1 à S et de S à G2 nécessite la réplication d'ADN est assuré par les ADN polymérase (Buchanan *et al.*, 2002). Les plantes sont constamment exposées à un large éventail de facteurs de stress environnemental ; Sujit *et al.*, (2011) ont présentés une protéine de réparation d'ADN, AtPol λ , un homologue de mammifères ADN polymérase λ chez *Arabidopsis*, à son rôle dans la réparation des lésions de l'ADN induite par l'UV durant les premiers stades du développement des semis. Et comme solanapyrone A inhibe l'ADN polymérase β et λ (Mizushina *et al.*, 2002) peut être elle inhibe aussi cette enzyme chez les graine de pois chiche et donc inhibe la croissance cellulaire et l'élongation des hypocotyles ; et la résistance des variétés de pois chiche peut être due a la détoxification de solanapyrone A par plusieurs enzymes de pois chiche.

3. L'effet antibactérien de solanapyrone A

Chez les procaryotes, les divisions du cytoplasme et de l'ADN sont couplées, les chromosomes fils attachés à la membrane plasmique se séparent l'un de l'autre lors l'extension de celle-ci. Cette prolifération, précédée d'un doublement des composants cellulaires, est rapide en conditions optimales de croissance. (Gaal *et al.*, 1997 ; Dworkin et

Losick, 2001). La toxicité et l'effet *in vitro* de solanapyrone A avec des concentrations précises sur des bactéries pathogènes dont la toxine est capable de bloquer la croissance bactérienne mériterait d'être étudiée. Peut être le mécanisme d'inhibition d'ADN polymérase qui est nécessaire à la division et à la croissance bactérienne est impliqué dans cette toxicité. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 présente une résistance à l'action de solanapyrone A, cette résistance mérite être étudiée en profondeur pour mieux comprendre le mécanisme exact.

4. L'effet des extraits des plantes et filtrats des bactéries sur la croissance mycélienne

On a utilisé dans notre expérience deux extraits de plantes et deux filtrats de bactéries pour tester l'activité antifongique sur *Ascochyta rabiei* et tester leur effet sur la production de solanapyrone A. Les deux extraits des plantes *Ruta montana*L. et *Carthamus Caeruleus* L. ont un effet inhibiteur sur la croissance fongique : les résultats de ce conceptuel reflètent clairement que ces plantes ont la capacité inhérente à induire les effets antifongiques sur la croissance du mycélium et par conséquent sur la prolifération de ces champignons; l'intensité relative de cet effet, toutefois, varie selon les concentrations d'extrait employée. A des concentrations élevées des extraits il y a une forte inhibition de croissance mycélienne; ces résultats sont pris en charge par le fait que les substances allélopathiques ont des effets sélectifs, en fonction de leur concentration, un effet inhibiteur ou stimulateur de la croissance de champignon (Paruis *et al.*, 1985 ; Cheema,1998). Les plantes produisent divers métabolites secondaires (allélochimiques) qui sont rejetées dans l'environnement. Certains d'entre elles ont une activité biologique sur d'autres plantes et microorganismes, un phénomène appelé allélopathie (Rice, 1984 ; Anaya,1999 ; Zzet, *et al.*, 2004). Les allélochimiques ont plusieurs cibles moléculaires, et certains de leurs processus physiologiques ou modes d'action ont été décrits (Einhellig, 1995, Reigosa *et al.*, 1999).

Les composés des allelochimiques ont démontrés qu'elles touchent de nombreux processus cellulaires dans les organismes ennemis, y compris la rupture de la perméabilité membranaire (Galindo *et al.*, 1999 ; Daizy *et al.* 2007), piège les ions (Lehman et Blum, 1999), inhibition du transport des électrons dans la photosynthèse et de la chaîne respiratoire, (Calera *et al.* 1995 ; Abraham *et al.* 2000), alternances de certaines activités enzymatiques (Cruz-Ortega *et al.*, 1990, Silva *et al.*, 1996, Politycka, 1998), et l'inhibition de la division cellulaire (Cruz-Ortega *et al.*, 1988, Anaya *et al.*, 1999).

l'extrait de *Ruta montana* L. a été plus inhibiteur sur la croissance fongique que l'extrait de *Carthamus Caeruleus* L. Ce qui peut être dû à la présence d'allelochimiques dans *Ruta montana* L. Comme les alcaloïdes, les acides aminés, les glucides et les phytohormones aux concentrations plus élevées par rapport à *Carthamus Caeruleus* L. (Chun-Mei *et al.*, 2008). L'activité fongistatique de l'extrait de *Ruta montana* et ses allelochimiques [8-méthoxypsoralène (8-MOP), 5-méthoxypsoralène (5-MOP) et 4-hydroxycoumarine] (précédemment isolée) a été évaluée contre les champignons pathogènes : *Fusarium solani*, *Pyrenochaeta lycopersici* et *Trichoderma viride*, ces résultats suggèrent un rôle potentiel pour l'extrait de la rue et son allelochimiques dans le contrôle des infections fongiques pathogènes (Oliva *et al.*, 1999). L'extrait des racines de *Carthamus caeruleus* est un inhibiteur efficace de la xanthine oxydase et il est un antioxydant important et a des propriétés piègeur de radicaux libres en raison de sa teneur plus élevée en acides phénoliques et flavonoïdes (Baghiani *et al.*, 2010). Outre ces deux extraits naturels notre étude a révélé un effet antagoniste des deux bactéries *Bacillus megaterium* et *Pseudomonas fluorescens* sur *Ascochyta rabiei*, et un effet inhibiteur de la croissance mycélienne, et l'efficacité d'inhiber la croissance fongique par *Pseudomonas fluorescens* a été plus importante que celle de *Bacillus megaterium*. Plusieurs espèces de *Bacillus* et *Pseudomonas* sont fréquemment utilisées comme agents de biocontrol, surtout puisque elles secrètent des enzymes hydrolytiques capables de

dégrader la paroi cellulaire (Chernin *et al.*, 2002). Alkhatib *et al.*, (2010) a signalé que *B.megaterium* NB-3 a été utilisée pour contrôler significativement la croissance des *Cycloconium oleaginum*, et *B.megaterium* a également été signalé à contrôler efficacement la croissance des champignons de *Rhizoctonia solani* sur les plants de soja en raison de la concurrence pour espace et nutriments (Alkhatib *et al.*, 2010). En plus de bactéries, l'antagonisme, était considérée comme un facteur important de suppression de la maladie (Zheng *et al.*, 2000). Kong *et al.*, (2010) a signalé que les métabolites de *B.megaterium* sont plus fortement inhibitrices d' *Aspergillus flavus* sur des plaques de PDA, qui a suggéré que *B. megaterium* peut inhiber les pathogènes en raison de certains composés toxiques accumulés dans le milieu de culture ou à cause de la production d'antibiotiques. Des bacilles produisant des antibiotiques ont été utilisés comme agents de lutte biologique contre les champignons pathogènes (Magnusson *et al.*, 2003). La souche *Bacillus* produit des antibiotiques importants et ils sont utilisés pour contrôler les maladies des plantes (Souto *etal.*, 2004 ; Leclère *et al.*, 2005). Aussi les *Pseudomonas* secrètent une grande variété d'antibiotiques comme 2,4 diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG), pyoluteorin, pyrrolnitrin, et hydrogen cyanide (HCN) (Raaijmakers *et al.*, 2002 ; Ramette *et al.*, 2003). Les *Pseudomonas*, principalement l'espèce *P. fluorescens*, sont connues depuis longtemps pour leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires dans certains champs, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro*. Cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes et de sidérophores. On note également pour certaines souches une capacité à induire les mécanismes de défense chez la plante (Kim *et al.*, 2004 ; Iavicoli *et al.*, 2003), mais dans la plupart des cas d'inhibition, le facteur déterminant est la production d'antibiotiques qui agissent directement sur l'agent pathogène. Le premier rapport sur l'utilisation d'un *Pseudomonas* produisant un antibiotique pour le contrôle d'un agent pathogène racinaire, en

l'occurrence *Rhizoctonia solani*, est venu de Howell et Stipatovic en (1980). Ces auteurs identifèrent la pyrrolnitrine produite par une souche de *Pseudomonas fluorescens* comme facteur permettant d'inhiber le pathogène, par contre, Thomashow et Weller, neuf ans plus tard, révèlent la première démonstration expérimentale, utilisant une approche génétique pour démontrer l'implication d'un antibiotique produit par une souche de *Pseudomonas* dans la suppression d'un agent phytopathogène. Ces derniers ont utilisé une souche de *P. fluorescens* productrice d'acide phénazine carboxilique, isolée de la rhizosphère du blé, et fortement antagoniste envers *Gaeumannomyces graminis*. Ce type de démonstration a été réalisé également pour d'autres composés comme le DAPG, la pyrrolnitrine, la pyoluteorine et le HCN (Haas et Keel, 2003). Ces résultats confirment l'importance des métabolites secondaires produites par la souche *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus megaterium* dans l'amélioration de la croissance des plantes et le contrôle des pathogènes fongiques.

5. L'effet des extraits des plantes et filtrats des bactéries sur la production de solanapyrone A

Les deux extraits naturels et les deux filtrats de bactéries ont présenté une activité antifongique sur *A.rabiei*, on a attendu alors à une inhibition sur la production de solanapyrone A sur les milieux liquide, en ajoutant les extraits et les filtrats avec les mêmes concentrations utilisées dans les milieux solides, mais on a trouvé une inhibition de production de solanapyrone A seulement à des concentrations proches de la CMI ou inférieures à elle, par contre il y a une activation de production de solanapyrone A au-delà de la CMI, c'est-à-dire tant qu'il y a une croissance des hyphes il n'y a pas une production de toxine. Donc selon ces résultats on peut dire que la diminution de production de toxine est en relation avec l'élimination de stress dans le milieu qui inhibe la croissance. Les champignons subissent des phases distinctes du cycle de vie de croissance (accumulation d'hyphes indifférenciées) et la reproduction (élaboration des structures de fructification) la commutation

entre ces deux phases est très réglementée (Adams *et al.*, 1998 ; Fischer *et al.*,2000) et l'initiation d'une des phases est régie par la perception d'une combinaison de conditions physiologiques et environnementales (Calvo *et al.*, 2001). Certaines de ces conditions, telles que la lumière (Mooney et Yager, 1990), éléments nutritifs (Bennett *et al.*, 1979), pH (Keller *et al.*, 1997),métaux (Cuero et Ouellet, 2005) et la chimie de la plante hôte (Goodrich-Tanrikulu *et al.*, 1995; Zeringue, 2000), ces conditions aussi affectent la mycotoxigénèse. Parmi les changements au cours de ce commutateur de phase sont les changements dans les profils des métabolites secondaires. La production des métabolites secondaires fongiques et sporulation sont associés temporellement et fonctionnellement (Adams et Yu,1998 ; Calvo *et al.*, 2001). Les métabolites secondaires dans *Aspergillus* et *Fusarium* par exemple sont associés à l'apparition de sporulation (Calvo *et al.*, 2001 ; Champe et El-Zayat, 1989), aussi la pénétration d'*A.rabiei* dans les tissus d'hôte est aidée par les toxines sécrétées durant la sporulation (Hölh *et al.*,1991). Certains métabolites secondaires agissent comme pigments protecteur des spores (Kawamura *et al.*, 1999; Ke et Luckner, 1979), de nombreux métabolites secondaires ont une activité antimicrobienne (Peláez, 2005),dont un rôle des produits chimiques de défense. Les Voies de signalisation de la protéine G réglementent couramment le développement fongique, la réponse au stress et l'expression des caractères de virulence, et la participation de la protéine G à ces processus a été montrée pour la majorité des phytopathogènes notamment *Cryphonectria parasitica*, *Magnaporthe grisea* et *Ustilago maydis*, ainsi que le modèle *Neurospora crassa* et le pathogène opportuniste et humain *Cryptococcus neoformans* (Lee *et al.*, 2003; Lengeler *et al.*, 2000). L'étude chez l'*Aspergillus* est l'une des premières preuves génétiques reliant la sporulation avec la production des mycotoxines et que les deux sont réglementées par des membres d'une voie de signalisation de la protéine G (Hicks *et al.*, 1997 ; McDonald *et al.*, 2004).Des études antérieures sur les protéines G chez *Aspergillus spp.*, a révélé que la production de

métabolites secondaires toxiques dans ces champignons sont contrôlées par les gènes $G\alpha$ (Yu et Keller, 2005). Les résultats indiquent que les protéines $G\alpha$ chez les champignons ont des effets différents sur la production de différents métabolites secondaires toxiques. Les auteurs ont également souligné que la protéine G est un cible des stratégies de contrôle de pathogénicité fongique (Kwon-Chung, 1998), pourrait conduire à des augmentations indésirables dans la production de métabolites secondaires de champignons indésirables (Tag *et al.*, 2000). Yamagishi *et al.*, (2006) ont examinés l'effet des protéines $G\alpha$ sur la biosynthèse d' un HST la AM-toxine chez *Alternaria alternata* , et ils ont trouvés que la production de cette toxine est reliéeaux cascades de régulation de la protéine $G\alpha$. La liaison d'un ligand à un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) est l'événement qui active la signalisation des protéines G. Ces récepteurs résidus dans la membrane cellulaire, où ils perçoivent des signaux extracellulaires comme la lumière, les ions, les acides aminés, les sucres, les acides nucléiques, les stéroïdes, les polypeptides et les acides gras, et transmet cette information sur l'environnement externe à travers la membrane à des protéines G hétérotrimériques comprenant des sous-unités $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$ (Pierce et al., 2002). Brièvement, ces premières étapes dans la transduction des signaux transmembranaires peuvent être réparties ainsi : activation de GPCR par la liaison de ligand, catalyse l'échange de guanine nucléotide (GTP en GDP) à la sous-unité $G\alpha$ associée à la protéine G hétérotrimérique. $G\alpha$ -GTP se dissocie de $G\beta\gamma$ et le demeure jusqu'à ce que la GTPase $G\alpha$ intrinsèque hydrolyse le GTP lié au GDP à nouveau (Dohlman, 2002 ; Hoffman, 2005). Quand le complexe $G\alpha$ et/ou $G\beta\gamma$ est dissocié il y a un relais des messages à autres effecteurs en aval ; chez les champignons, ces voies de deuxième messenger sont principalement (i) des cascades de phosphorylation des protéines kinase (ii) les voies de l'adénylate cyclase AMPc /PKA (Lengeler *et al.*, 2000) et le signal est piégé lorsque $G\alpha$ β γ réassociés. la GTP hydrolysée par $G\alpha$ peut être améliorée par les protéines RGS (régulateurs de la signalisation des protéines G, qui accélèrent la désactivation

de la protéine G de signalisation et fournissent un réglage fin pour le système (Siderovski *et al.*, 1999). Comme nous le comprenons actuellement, la cascade du signal de la protéine G relie la sporulation et le métabolisme secondaire chez plusieurs champignons et peut être chez *A.rabiei* selon nos résultats sont centrés sur une voie du signal de transduction de la protéine G / AMP_c / PKA. Les taux d'AMPC dépendent des activités opposées de l'adénylate cyclase et phosphodiésterases. Dans la voie de la protéine G/AMP_c /PKA, l'adénylate cyclase est stimulée (ou réprimée) par G α ou G β γ , ce qui entraîne une accumulation une augmentation ou une diminution du second messenger, l'AMP cyclique (AMP) et ce dernier active la protéine kinase A (PKA) (Neves *et al.*, 2002 ; Pawson et Scott, 2005 ; Pierce *et al.*, 2002). Selon les connaissances actuelles au sujet de cette voie et sa relation avec la production des métabolites secondaires, on peut déduire et supposer le phénomène de l'effet des extraits naturels et filtrats des bactéries sur la production de solanapyrone A par la voie de FadA qui est le G α chez tous les mycètes filamenteux. A faible concentration de l'extrait de plante ou de filtrat bactérien il y a une activation de croissance de mycélium peut être par l'activation de la liaison de domaine G α de la protéine G avec l'ATP, cause l'activation de PKA responsable de l'inhibition de la production de solanapyrone A, par contre à des concentrations élevée d'extraits et de filtrats il y a une inhibition de croissance mycélienne qui cause l'inactivation de PKA par l'accumulation de AMP_c. Donc selon les études passées, on peut expliquer l'effet des extraits des plantes et les filtrats des bactéries par l'inactivation de la liaison G α -ATP, et donc l'activation de la protéine RSG ; ce qui explique la modération entre les deux voix opposées autour de la concentration minimale inhibitrice, et ramène vers une régulation entre la croissance mycélienne et la production de solanapyrone A. Dans le cas des filtrats des deux bactéries *Bacillus megaterium* et *Pseudomonas fluorescens* il y a peut être une activation de la protéine régulatrice de la protéine G β , et cela conduit alors à une sporulation sexuelle comme

on l'a révélé sur le prélèvement de contour de la zone d'inhibition où la concentration de filtrat bactérien a été faible (croissance mycélienne), sachant que $G\beta$ a été trouvé chez *A.nudilans* contribue positivement à la signalisation de la croissance végétative et sexuelle, tout en réprimant le développement asexué (Seo et Yu, 2006) et l'apparition de la pigmentation noire dans cette région peut être due à la suppression de la protéine régulatrice de $G\alpha$ (Han *et al.*, 2004b) sachant que *Ascochyta rabiei* produit un célèbre polyketides fongiques(ArPKS1),1,8-dihydroxynaph-naphtalène-mélanine(DHN-mélanine),qui s'accumule dans les fructifications asexuées et sexuées et qui cause la couleur noire (Akamatsu *et al.*,2010)

CONCLUSION

L'antracnose causée par *Ascochyta rabiei* (anamorphe), *Didymella rabiei* (téléomorphe) est la maladie la plus grave du pois chiche dans le monde et en Algérie.

L'agent pathogène produit des toxines solanapyrone, et ces toxines peuvent provoquer des symptômes semblables à l'antracnose.

La production de solanapyrone par *Ascochyta rabiei* varie selon les milieux et elle est maximale dans le milieu Czapek Dox additionné par les cations Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , et Mn^{2+} .

La solanapyrone A inhibe l'élongation des hypocotyles de plusieurs génotypes de pois chiche, le moindre pourcentage d'inhibition révèle un génotype résistant FLIP 97- 220C, trouvé dans une autre étude dans le champ très résistant à la maladie causée par *Ascochyta rabiei* ; notre étude indique que cette résistance est due à un mécanisme impliqué par ce génotype pour résister à la solanapyrone A.

Des recherches récentes ont démontré l'existence d'une enzyme polymérase λ chez les plantes, qui intervient dans la réparation d'ADN endommagé et dans sa réplication; ceci nous conduit à penser que peut être la solanapyrone A inhibe la polymérase λ des graines provoquant l'inhibition de la croissance cellulaire des hypocotyles.

De même, chez les bactéries pathogènes solanapyrone A inhibe leur croissance bactérienne peut être par l'inhibition de polymérase β et λ ; mais *Pseudomonas aeruginosa* présente une résistance à la solanapyrone A, alors on met en question les produits de cette bactérie qui réagissent avec cette toxine.

L'inhibition de la croissance mycélienne d'*Ascochyta rabiei* par l'extrait naturel de *Ruta montana* L., de *Carthamus Caeruleus* L. et les filtrats de bactéries *Bacillus megaterium* et *Pseudomonas fluorescens* sur le milieu solide mène vers une lutte biologique qui réduit

l'incidence de la maladie : soit par les produits allélochimiques produites par les extraits naturels; soit par les enzymes ou les antibiotiques secrétées par les bactéries.

Cependant le test de la production de solanapyrone A sur le milieu liquide en utilisant les différentes concentrations des extraits naturels et filtrats bactériens et la grande possibilité d'être la voie de protéine G et en relation avec la production des métabolites secondaires d'*Ascochyta rabiei*, révèlent que la protéine G définit comme point de contrôle important d'expression différentielle des métabolites secondaires fongiques reste plus tard à découvrir.

L'importance de cette étude apparaitre on se basant sur l'effet antibactérien de solanapyrone A peut être dans la biotechnologie comme un traitement pharmacologique vue son activité inhibitrice de la polymérase β . Et l'utilisation des extraits naturels ou les bactéries antagonistes dans la lutte contre *Ascochyta rabiei* et réduire la maladie de la d'antracnose.

Perspectives

- Il faut signaler que cette étude a été faite pour la première fois sur *Ascochyta rabiei* qui la conduit à une étude préliminaire pour savoir plus sur les mécanismes régulateur de la production de solanapyone A.
- Dans cette étude les deux extraits des plantes de *Ruta montana*L. et *Carthamus Caeruleus* L. et les filtrats des bactéries *Bacillus megaterium* et *pseudomonas fluorescens* ont une activité antifongique *in vitro* sur *Ascochyta rabiei* reste à expérimenté *in vivo* en utilisant les différentes concentrations pour l'investigation de leur potentiels et leur utilisations.
- Identifier les produits allélochimiques des extraits naturels intervenant dans l'activité antifongique et aussi les métabolites secrétés par *Bacillus megaterium* et *Pseudomonas fluorescens* qui ont un rôle dans l'inhibition fongique.
- Il faut essayer ces composés sur autres phytopathogènes pour réduire autre maladie.
- Rechercher les gènes impliqués dans la biosynthèse de solanapyrone A et déterminer les voies de régulation de la production de cette toxine, et la relation entre la protéine G membranaire et la biosynthèse de cette toxine en utilisant *Aspergillus nidulans* comme exemple.

RESUME

La production de solanapyrone A a été élevée en milieu liquide de Czapek Dox additionné des cations ou l'isolat d'*A. rabiei* a été cultivées. La solanapyrone A inhibe l'élongation des hypocotyles différemment de plusieurs génotypes de pois chiche. Ce pourcentage d'inhibition varie entre 39.1 % pour la variété FLIP 97-220C et 59.84 % pour la variété FLIP 85-45C. cette toxine inhibe aussi la croissance des bactéries pathogènes *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii* avec des zones d'inhibition 8.5mm, 15.33mm, 12.83mm, 10.66mm et 13.66mm respectivement; mais *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 présente une résistance à solanapyrone A. cette inhibition peut être due a cause de l'inhibition de solanapyrone A à l'ADN polymérase β et λ . Les extraits naturels de *Ruta montana* L. et *Carthamus caeruleus* L. et les filtrats de bactéries *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus megaterium* ont un effet antifongique sur *Ascochyta rabiei* et ils présentent une variation dans la production de solanapyrone A.

SUMMARY

Solanapyrone A production was high in Czapek Dox nutrients supplemented with cations where the isolate of *Ascochyta Rabiei* has grown. The solanapyrone A inhibits the elongation of hypocotyls differently from several genotypes of chickpea. The percent inhibition varies between 39.1% for the variety FLIP 97-220 c and 59.84% for the variety FLIP 85 - 45 c. This toxin also inhibits growth pathogenic bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii* with zones inhibition of 8.5 mm, 15.33 mm, 12.83 mm, 10.66 and 13.66 mm respectively; But *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 presents a resistance to solanapyrone A. This inhibition may be due because of the inhibition of solanapyrone A to DNA polymerase β and λ . Natural extracts of *Ruta montana* L. *Carthamus caeruleus* L. et bacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus megaterium* filtrates have an antifungal effect on *Ascochyta rabiei* and they present a variation in the production of solanapyrone A.

REFERENCES

- Abraham D., Braguini W.L., Kelmer-Bracht A.M. and Ishii-Iwamoto E.L. (2000). Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. *J. Chem. Ecol.* 26: 611–624.
- Adams T.H. and Yu J.H. (1998). Coordinate control of secondary metabolite production and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:674-7.
- Ahmad Z., Ghafoor A., Bashir M. (2006). Effect of seed borne pathogens on seed longevity in chickpea and cowpea under storage at 25°C to -18°C. *Seed Sci. and Technol.* 34:69-75.
- Akamatsu H.O., Chilvers M. I., Stewart, J. E. and Peever T. L. (2010). Identification and function of a polyketide synthase gene responsible for 1,8-dihydroxynaphthalene-melanin pigment biosynthesis in *Ascochyta rabiei*. *Curt. gene*, 56: 349-60.
- Alam S.S., Bilton J.N., Slawin A.M.Z., William D.J., Sheppard R.N. and Strange, R.N. (1989). Chickpea blight: production of the phytotoxins solanapyrones A and C by *Ascochyta rabiei*. *Phytochem.* 28: 2627-2630.
- Alkhatib M., Alhussaen K., ElBanna N. and Zyadeh M. (2010). Biological control of olive leaf spot (peacock spot disease) caused by *Cycloconium oleaginum*. *J. Microbiol. and Antimicrob.* 2: 64-67.
- Alspaugh J. A., Perfect J. R. and Heitman J. (1997). *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein alpha subunit GPA1 and cAMP. *Genes. Dev.* 11:3206–3217.
- Anaya A.L. (1999). Allelopathy as a tool in the management of biotic resources in agroecosystems. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 18: 697–739 .
- Anonyme, 2011. <http://umaine.edu/ipm/ipddl/plant-disease-images/ascochyta-leaf>.
- Armstrong C., Chongo G., Gossen B.D. and Duczek L. (2001). Mating type distribution and incidence of the teleomorph of *Ascochyta rabiei* (*Didymella rabiei*) in Canada. *Can. J. Plant. Pathol.* 23:110-113.
- Baghiani A., Sabah B., Farida B., and Khennouf S. (2010). Antioxidant and radical scavenging properties of *Carthamus caeruleus* L. extracts grow wild in Algeria flora. *Comuni. Sci.* 1:128-136.
- Bahti P. and Strange N.R. (2004). Chemical and biochemical reactions of solanapyrone A, a toxin from the chickpea pathogen, *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr: Physiological and molecular. *Plant Pathol.* 64: 9-15.
- Bayer E., Buttler K.P., Finkenzeller X. and Gran, J. (1990). Guide de la flore méditerranéenne. caractéristiques, habitat, distribution et particularités de 536 espèces. Editions delachaux et Niestlé, S.A. Neuchâtel (Switzerland).

- Bennett J.W. and Lasure L.L.(1991). More gene manipulations in fungi. *Academic Press*.
- Bennett J. W., Rubin P. L., Lee L. S and Chen P. N. (1979). Influence of trace elements and nitrogen source on versicolorin production by a mutant strain of *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathol.* 69:161–166.
- Bouznad Z., Maatougi M.E. and Labdi M. (1996). Importance et distribution géographique des maladies fongiques des légumineuses alimentaires en Algérie. *In: Proceedings du Symposium Régional sur les Maladies de Céréales et Légumineuses Alimentaires*, Rabat: 13-19.
- Buchanan B.B., Gruissem W. and Jones RL. (2002). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. *Amer. Soci. of Plant Physio.*
- Bu'Lock J. D. (1961). Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. *Adv. Appl. Microbiol.* 3:293–342.
- Calera M. R., Anaya A. L. and Gavilanes-Ruiz M. (1995). Effect of phytotoxic resin glycoside on activity of H⁺-ATPase from plasma membrane . *J. Chem.Ecol.* 21: 289–297.
- Calvo A. M., Gardner H. W. and Keller N. P. (2001). Genetic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* 276:20766–20774.
- Champe S. P. and El-Zayat A. A.E. (1989). Isolation of a sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 171:3982–3988.
- Cheema, Z.A.(1998). Weed control in wheat through sorghoum allelochemicals. Ph.D. Thesis, University of Agriculture, Faisalabad.
- Chen Y.M. and Strange R.N. (1991). Synthesis of the solanapyrone phytotoxins by *Ascochyta rabiei* in response to metal cations and development of a defined medium for toxin production. *Plant Pathol.*40:401-407.
- Chen Y. and Strange R.N. (1994). Production of a proteinaceous phytotoxin by *Ascochyta rabiei* grown in expressed chickpea sap. *Plant Pathol.*43: 321-327.
- Chernin L. and Chet I. (2002). Microbial enzymes in biocontrol of plant pathogens and pests in *Enzymes in the Environment:Activity, Ecology, and Applications*.171–225.New York, NY, USA.
- Chun-Mei H., Kai-Wen P., Ning W., Jin-Chuang W. and Wei L. (2008). Allelopathic effect of ginger on seed germination and seedling growth of soybean and chive.
- Colrat S., Deswarte C., Latche A., Klæbe A., Bouzayen M., Fallot J., Roustan J.P. (1999). Enzymatic detoxification of eutypine, a toxin from *Eutypa lata*, by *Vitis vinifera* cells: partial purification of an NADPH- dependent aldehyde reductase. *Planta.* 207:544–50.
- Cruz-Ortega R., Anaya A.L., Gavilanes-Ruz M. ,Sanchez Nieto S.and Jime'nez-Estrada M. (1990) Effect of diacetyl piquerol on the H⁺-ATPase activity of microsomes from *Ipomoea purpurea*.*J. Chem. Ecol.*16: 2253–2261.

Cruz-Ortega R., Anaya A.L., Ramos L. (1988). Effects of allelopathic compounds of corn pollen on respiration and cell division of watermelon. *J Chem. Ecol.*14: 71–86.

Cuero R. and Ouellet T. (2005). Metal ions modulate gene expression and accumulation of the mycotoxins aflatoxin and zearalenone. *J. Appl. Microbiol.* 98: 598–605.

Daizy R., Manpreet B.K., Harminder P.S. and Ravinder K.K. (2007). Phytotoxicity of a medicinal plant, *Anisomeles indica*, against *Phalaris minor* and its potential use as natural herbicide in wheat fields. *Crop Protect.* 26: 948-952.

Dickman M.B., Podila G.K. and Kolattukudy P.E. (1989). Insertion of a cutinase gene into a wound pathogen enables it to infect intact host. *nature* , 342, 446–448.

Dohlman H.G. (2002). G proteins and pheromone signaling. *Annu. Rev. Physiol.* 64:129–152.

Dworkin J. and Losick R. (2001). Linking nutritional status to gene activation and development. *Genes Dev.*15:1051-1054.

Einhellig F.A. (1995). Mechanism of action of allelochemicals in allelopathy. *Allelopa.* 582, 96–116.

Farshid M., Kavus K., Bakht N., Mansur N., Iraj K. and Hossein S. P. (2008). Study on reaction of chickpea international lines to *Ascochyta* blight in dryland areas. *Agric. res.* 26 P

Ferrin L.J. Beckman R.A. Loeb L.A. and Mildvan A.S. (1986). Kinetic and magnetic resonance studies of the interaction of Mn substrates and templates with DNA polymerases. In: *Manganese in Metabolism and Enzyme Function. Academic Press Inc.* 259 273. London

Fischer G., Muller T., Schwalbe R., Ostrowski R., Dott W. (2000). Species-specific profiles of mycotoxins produced in cultures and associated with conidia of airborne fungi derived from biowaste. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 203:105–16.

Gaal T., Bartlett M.S. Ross W., Turnbough J.r. and Gourse R. L. (1997). Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria. *Science.* 278:2092-2097.

Galindo J.C.G., Hernandez A., Dayan F.E., Tellez M.R., Macias F.A., Paul R.N., Duke S.O. (1999). Dehydrozalanin C, a natural quiterpenolide, causes rapid plasma membrane leakage. *Phyto-chemistry.* 52: 805–813.

Goodrich-Tanrikulu M., Mahoney N. and Rodriguez S. B. (1995). The plant growth regulator methyl jasmonate inhibits aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Microbiol.* 141:2831–2837.

Haider M.M., Soulaïman E.D and Dawwood R.K. (1986). Effect of culture filtrate of fungi on seed germination and seedling development of sunflower. *J. Biol. Sci. Res.* 17: 141-150.

Hamid K. and Strange R. N., (2000). Phytotoxicity of solanapyrones A and B produced by the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. and the apparent metabolism of solanapyrone A by chickpea tissues. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.*, 56, 235–244.

- Han K. Seo H. and Yu J.H. (2004b). Regulators of G-protein signalling in *Aspergillus nidulans*: RgsA downregulates stress response and stimulates asexual sporulation through attenuation of GanB (Ga) signalling. *Mol. Microbiol.* 53, 529–540.
- Haas D., and Keel C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:117-153.
- Haware P.M., Nene Y.L. and Mathur S.B. (1986). Seed borne diseases of chickpea. *Bull. Inst. of Seed Pathology for Developing Countries, Copenhagen, Denmark.* 1: 8-15.
- Heifussan R. and Williams P.H. (1996). *Encyclopedia of plant physiology, New Series, Physiol. Plant Pathol.*
- Hicks J.K, Yu J.H., Keller N.P., Adams T.H. (1997). *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G alpha protein-dependent signaling pathway. *EMBO J.* 16:4916-23.
- Howell C. R. and Stipanovic R.D. (1980). Suppression of *Pythium ultimum* induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluterin. *Phytopathol.* 70:712-715.
- Hoffman C.S. (2005). Except in every detail: comparing and contrasting G-protein signaling in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. cell.* 4:495-503.
- Höhl B., Weidemann C., Höhl U. and Barz W. (1991). Isolation of solanapyrone A, solanapyrone B and solanapyrone C from culture filtrates and spore germination fluids of *Ascochyta rabiei* and aspects of phytotoxin action. *J Phytopathol. Phytopathol Z.* 132:193–206.
- Höhl B., Pfautsch M., and Barz W. (1990). Histology of disease development on resistant and susceptible cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) inoculated with spores of *Ascochyta rabiei*. *J. Phytopathol.* (Berlin) 129: 31–45.
- Iavicoli A., Boutet E., Buchala A. and Métraux J.P. (2003). Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 851-858.
- Ichihara A., Tazaki H. and Sakamura S. (1983). Solanapyrones A, B and C, phytotoxic metabolites from the fungus *Alternaria solani*. *Tetrahedron Lett.* 24: 5299-5432.
- Jackson M.A., Slininger P.J. and Bothast R J. (1989) Effects of zinc iron, cobalt, and manganese on *Fusarium moniliforme* NRRL 13616 growth and fusarin C biosynthesis in submerged cultures. *Applied and Enviro.* 55:649- 655.
- Javier A. D. (2011). Isolation of polyketide synthase genes associated with solanapyrone production in *Ascochyta rabiei*. *Proceedings of the North Dakota Aca.Sci.*
- Jayakumar P., Gan Y. T., Gossen B. D., Warkentin T. D. and Banniza S. (2005). *Ascochyta* blight of chickpea: infection and host resistance mechanisms. *Canadian J. Plant Pathol.* 27: 499 – 509.

- Jones J.D.G. and Dangl J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*. 444: 323-329
- Kaiser W.J. and Küsmenoglu I. (1997). Distribution of mating types and the teleomorph of *Ascochyta rabiei* on chickpea in Turkey. *Plant Dis.*81: 1284-1287.
- Kaiser W.J., Coca F.W. and Vega S. (2000a). First report of *Ascochyta* blight of chickpea in Latin America. *Plant Dis.* 84: 102.
- Kalyanasundaram R. and Sarawathi-Devi L. (1955). Zinc in the metabolism of *Fusarium vasinfectum*. *Atk. Nature* (London). 175, 945.
- Kanouni H., Taleei A. and Okhovat M. (2011). *Ascochyta* blight (*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.) of chickpea (*Cicer arietinum* L.): Breeding strategies for resistance. *Int. J. Plant Breed. Genet.*5: 1-22.
- Kasahara K., Miyamoto T., Fujimoto T., Oguri H., Tokiwano T., Oikawa H., Ebizuka Y. and Fujii I. (2010). Solanapyrone Synthase, a Possible Diels–Alderase and Iterative Type I Polyketide Synthase Encoded in a Biosynthetic Gene Cluster from *Alternaria solani*. *Chem.Bio.Chem.* 11: 1245–1252.
- Kawamura C., Tsujimoto T. and Tsuge T. (1999). Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol.Plant.Microbe.Interact.* 12, 59–63.
- Kaur S. (1995). Phytotoxicity of solanapyrones produced by the fungus *Ascochyta rabiei* and their possible role in blight of chickpea (*Cicer arietinum*). *Plant Sci.* 109:23-29.
- Ke H.H. and Luckner M. (1979). Structure and function of the conidiospore pigments of *Penicillium cyclopium*. *Z.Allg.Mikrobiol.*19:117-122.
- Kern H., Naef-Roth S. and Rufner F. (1972). The influence of nutritional factors on the formation of naphthazarin derivatives by *Fusarium martii* var *pisi*. *Phytopatho.* 74: 272- 280.
- Keller N.P. and Hohn T.M. (1997). Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal.Geneti.Biol.* 21: 17–29.
- Khan M.S.A., Ramsey M.D., Corbiere R., Infantino A., Porta-Puglia A., Bouznad Z., Scott E.S.(1999). *Ascochyta* blight of chickpea in Australia: identification, pathogenicity and mating type. *Plant Pathol.*48:230–434.
- Khune M.M. and Kapoor J.M. (1980). *Ascochyta rabiei* synonymous with *Phoma rabiei*. *Indian Phytopathol.* 33:119-120.
- Kim M. S., Kim Y. C., and Cho B. H. (2004). Gene expression analysis in cucumber leaves primed by root colonization with *Pseudomonas chlororaphis* upon challenge inoculation with *Corynespora cassicola*. *Plant Biol.* 6:105-108.
- Kong Q., Shan S., Liu Q., Wang X., Yu F. (2010). *International Journal of Food Microbiol.* 139: 31–35.

Kronstad J., A., De Maria D., Funnell R. D., Laidlaw N., Lee M.M. and Ramesh M. (1998). Signaling via cAMP in fungi: interconnections with mitogen-activated protein kinase pathways. *Arch. Microbiol.* 170:395–404.

Kreuz K., Tommasini R., Martinoia E.(1996). Old enzymes for a new job herbicide detoxification in plants. *Plant Physiol.*111:349–53.

Küçük Ç.and Kivanç M.(2003). Isolation of *Trichoderma* spp. and their antifungal, biochemical and physiological features. *Turk. J. Biol.*, 27: 247-253.

Kwon-Chung K. J., Goldman W. E., Klein B. and Szaniszló P. J. (1998). Fate of transforming DNA in pathogenic fungi. *Med. Mycol.* 36:38-44.

Lengeler K. B., Davidson R. C., D'Souza C., Harashima T., Shen W. C., Wang P., Pan X. W., Waugh M. and Heitman J. (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:746-785.

Latif Z., Shahid A.A., Riazuddin S.(1998). Production of phytotoxins in chickpea plants infected with *Ascochyta rabiei*. *Pak.J.Biochem.Mol. Biol.*31:48–60.

Latif Z., Strange R.N., Bilton J. and Riazuddin S. (1993). Production of the phytotoxins, solanapyrones A and C and Cytochalasin D among nine isolates of *Ascochyta rabiei*. *Plant Pathol.*42:172–80.

Leclère V., echet M.B. and Adam A. (2005). Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities, *App. Envir Microb.*71:4577–4584.

Lee N., D'Souza C.A. and Kronstad J.W. (2003). Of smuts,blasts, mildews, and blights: cAMP signaling in phytopathogenic fungi. *Annu.Review. Phytopathol.* 41:399–427.

Lehman M.E. and Blum U. (1999). Evaluation of ferulic acid uptake as a measurement of allelochemical dose: Effective concentration. *J. Chem. Ecol.*, 25: 2585–2600.

Lepoivre P. (2003). *Phytopathologie*, De Boeck and Larcier eds.513 P.

Lindow S.E., Hecht-Poinar E.I. and Elliot V.J.(2002).Phyllosphere microbiology. *Amer. Phytopath. Soci.*

Luthra J.C., Sattar A. and Bedi K.S. (1935). Life history of gram blight (*Ascochyta rabiei*) on gram and its control in the Punjab. *Agric.Lives. India.*5:489-498.

Lynch J.M. (1990). The rhizosphere. *Wiley*, New York.

Magnusson J.,Stron K.,Rooa R.,Sjogren J.,Schniirer J.(2003). *FEMS Microbiol. Letters.* 219:129-135.

Maplestone R. A., Stone M. J. and Williams D. H. (1992). The evolutionary role of secondary metabolites. *Gene.* 115:151–157.

- Mauch-Mani B., Métraux J.P. (1998). Salicylic Acid Systemic Acquired Resistance to Pathogen Attack. *Annals of Botany*. 82: 535-540.
- McDonald T., Devi T., Shimizu K., Sim S.C. and Keller N.P. (2004). Signaling events connecting mycotoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus* and *Fusarium* spp. *New Hori. Mycot. Ass. Food Saf.* 139-147.
- Montesinos E. (2003). Plant-associated microorganisms: a view from the scope of microbiology. *Int. Microb.* 6: 221-223.
- Mizushima Y., Kamisuki S., Kasai N., Shimazaki N., Takemura M., Asahara H., Linn S., Yoshida S., Matsukage A., Koiwai O., Sugawara F., Yoshida H. and Sakaguchi K. (2002). A plant phytotoxin, solanapyrone A, is an inhibitor of DNA polymerase beta and lambda. *J. Biol. Chem.* 277:630–638.
- Mooney J.L. and Yager L.N. (1990). Light is required of conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes. Dev.* 4:1473-1482.
- Moreau R T. (1987). Calcium-binding proteins in fungi and higher plants. *J. tif Dairy Sci.* 70:1504-1512.
- Morrall R.A.A. and McKenzie D.L. (1974). A note on the inadvertent introduction to North America of *Ascochyta rabiei*, a destructive pathogen of chickpea. *Plant Dis. Rep.* 58: 342-345.
- Nene Y.L., Sheila V. and Sharma S. (1996). A world list of chickpea and pigeon pea pathogens. *ICRISAT Pulse Pathol. Progr. Rep.*
- Nene Y.L. (1982). A review of Ascochyta blight of chickpea. *Trop. Pest Man.* 28: 61-70.
- Niehaus W.G.J. and Jiang W. (1989). Nitrate induces enzymes of the mannitol cycle and suppresses versicolorin synthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopath.* 107:131-139.
- Neves S.R., Ram P.T. and Iyengar R. (2002). G protein pathways. *Scie.* 296: 1636–1639.
- Oliva A., Lahoz E., Contillo R. and Aliotta G. (1999). Fungistatic activity of *Ruta graveolens* Extract and its allelochemicals. *J. Chem. Ecol.* 22:1125-1130.
- Pan Y., Subbarao D.V., Mann K.H., Brown R.G. and Pocklington R. (1996a) Effects of silicate limitation on the production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. I. Batch culture studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 131: 225- 233.
- Pan Y., Subbarao D.V., Mann K.H., Li W.K.W. and Harrison W.G. (1996b). Effects of silicate limitation on production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. II. Continuous culture studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 131: 235- 243.
- Parius C.E., Jessop R.S. and Ronette J.V. (1985). Selective regulation of germination and growth of annual weeds by crop residues. *Weed Res.* 25: 415-421.
- Pawson T. and Scott J.D. (2005). Protein phosphorylation in signaling 50 years and counting. *Treds. Biochem. Sci.* 30: 286–290.

- Peláez F.(2005).Biological activities of fungal metabolites.*Ind. Mycol.* 49–92.
- Perrot-Rechenmann C. (2010). Cellular Responses to Auxin: Division versus Expansion Cold Spring Harbor. *Perspe. Biol.*, 2:1-15.
- Pierce K.L., Premont R.T. and Lefkowitz R.J. (2002). Seven transmembrane receptors.*Nature Rev.Mol.Cell.Biol.*3: 639–650.
- Politycka B. (1998). Phenolics and the activities of phenylalanine ammonia-lyase, phenol-b-glucosyltransferase and b-glucosidase in cucumber roots as affected by phenolic allelochemicals.*Acta Physiol Plant.* 20: 405–410.
- Raaijmakers J.M., Vlami M. and de Souza J.T. (2002).Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek.*81: 537–547.
- Ramette M., Frapolli G., D'efago and Moenne-Loccoz Y. (2003). Phylogeny of HCN synthase-encoding *hcnBC* genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability, *Molecular Plant-Microbe Interactions*,16 (6): 525–535.
- Rapilly F. (1968). Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Ann. Epi.*101. p82
- Reigosa M.J., Sanchez-Moreiras A., Gonzalez L. (1999). Ecophysiological approach in allelopathy. *Plant Sci.* 18: 577–608.
- Remmal A., Bouchikhi T., Rhayour K., Ettayebi M. and Tantaoui- Elaraki A. (1993). Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J. Ess. Oil Res.*5:179-184.
- Rice E.L. (1984). Allelopathy. *Academic press Inc.*USA, p 422.
- Sattar A. (1934). A comparative study of the fungi associated with blight disease of certain cultivated leguminous plants. *Trans. Br. Mycol. Soc.*13:276-301.
- Seo J.A. and Yu J.H. (2006). The phosducin-like protein PhnA is required for Gβγ-mediated signaling for vegetative growth, developmental control and toxin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*.*Eukar.Cell.*5:400-410.
- Shahid A.A., Riazuddin S. (1998). Presence of solanapyrone C in blight infected chickpea plants. *Inter.Chickpea Pigeon pea News Letter.*5:15–16.
- Shahid A.A. and Riazuddin S. (2000). Chickpea blight caused by *Ascochyta rabiei* and isolation of phytotoxic compounds from culture filtrates of the fungus. *PakiJ. Biochem. Mol. Biol.*33:3–7.
- Shahid A.A., Latif Z. and Riazuddin S.(1998). Comparison of phytotoxin(s) production among two isolates of *Ascochyta rabiei* varying in virulence. *Pak.J.Plant Sci.*4:1–11.

- Shaw P.D. (1991). Production and isolation. In: Toxins in Plant Disease . pp. 38 *Academic Press Inc.* New York.
- Shtienberg D., Vintal H., Brener S. and Retig B. (2000). Rational management of *Didymella rabiei* in chickpea by integration of genotype resistance and postinfection application of fungicides. *Phyto.* 90: 834-842.
- Siderovski D.P., Strockbine B. and Behe C.I. (1999). Whither goest the RGS proteins. *Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol.*34: 215–251.
- Silva M.G., Costa R.A., Ferrarese M.L.L. and Ferrarese-Filho O. (1996). Effects of phenolics compounds on soybean urease activity. *Arq Biol Tecnol.* 39: 677–683.
- Smith J.E and Moss M.O. (1985). Mycotoxin Formation. *Analy Signif.* 31-49.
- Souto G.I., Correa O.S. and Montecchia, M. S. (2004). Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *J.App.Microb.* 97:1247–1256.
- Stone M. J. and Williams D. H. (1992). On the evolution of functional secondary metabolites (natural products). *Mol. Microbiol.* 6:29–34.
- Strange R.N. (2003). Introduction to Plant Pathology. 464 p. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- Sujit R. ,Swarup R. C., Sanjay K.R.S. and Kali P.D. (2011). *AtPolλ*, A Homologue Of Mammalian DNA Polymerase λ In *Arabidopsis thaliana*, Is Involved In The Repair Of UV-B Induced DNA Damage Through Dark Repair Pathway. *Plant Cell Physiol.*
- Tag A., Hicks J., Garifullina G., Ake C., Phillips T. D., Beremand M. and Keller N. (2000). G-protein signalling mediates differential production of toxic secondary metabolites. *Mol.microb.* 38: 658-65.
- Taleei A., Kanouni H., Baum M., Peyghambari S.A., Okhovat S.M. and Abang M. (2008). Identification and mapping of QTLs for resistance to ascochyta blight (Pathotype III) in chickpea. Proceedings of the 2nd International Conference on Future Generation Communication and Networking, Hainan Island, FGCN, China: 51-54.
- Trail F., Mahanti N. and Linz J. (1995). Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Microb.* 141:755–765.
- Trapero-Casas A. and Kaiser W.J. (1992a). Development of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, on chickpea straw. *Phytopath.* 82:1261-1266.
- Trapero-Casas A. and Kaiser W.J. (1992 b). Influence of temperature, wetness period, Plant age and inoculation concentration on infection and development of ascochyta blight of chickpea. *Phytopath.* 82: 589-596.

Thomashow L. S. and Weller D. M.(1990), Role of antibiotics and siderophores in biocontrol of take-all disease of wheat. *Plant and Soil*.129: 93–99.

Van den Berg C., Willemsen V., Hendriks G., Weisbeek P. and Scheres B.(1997). Shortrange control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature*. 20: 287-289.

Vallee B.L. (1983). Zinc in biology and biochemistry. *Zinc Enz*.1-24

Vincent M. N., Harrison L. A., Brackin J. M., Kovacevich P. A., Murkerji P., Weller D. M., and Pierson E. A. (1991). Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. Environ. Microbiol*. 57:2928-2934.

Weinberg F.D. (1970). Biosynthesis of secondary metabolites roles of trace metals. *Advances in Microbial Pin Strat*. 4:1-44

Wheeler H.E., Luke H.H. (1963). Report and Abstract of the Annual Meeting of the Southern Division of the American Phytopathological Society.44: p.334.

White J.P and Johnson G.T. (1971). Zinc effects on growth and cynodontin production of *Helminthosporium cynodontis*. *Mycol*.63:548-556.

Yamagishi D., Otani H. and Kodama M. (2006). G protein signaling mediates developmental processes and pathogenesis of *Alternaria alternata*. *Mol. plant microb. interact*. 19 :1280-1288.

Yoder O.C. (1980).Toxins in pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopath*.18:103–109.

Yu J.H. and Keller N.P. (2005). Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi.*Ann.Rev.Phytopath*.43: 437–458.

Zeringue H.J. (2000). Identification and effects of maize silk volatiles on cultures of *Aspergillus nidulans*.*J.Agric.Food.Chem*.48: 921-925.

Zerroug, M. M., Bouznad, Z., Larous, L. and Strange R. N. (2007). Production of solanapyrone A by Algerian isolates of the toxicity of culture filtrates to chickpea (*Cicer arietinum*) seeds and seedlings. *J. Plant Patho*.89: 227-232.

Zheng N, Wang P, Jeffrey PD, Pavletich NP.(2000). Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell*.102: 533-539.

183

Zzet K.L. and Yusuf Y. (2004). Allelopathic Effects of Plants Extracts Against Seed Germination of some Weeds .*Asian J. Plant Sci*. 3: 472-475.

ANNEXE

Composition des milieux de cultures :

➤ Czapek Dox (Chen *et al.*, 1991) :

NaNO ₃	2.0 g/l
KCl	0.5 g/l
Mg-glycérophosphate	0.5 g/l
FeSO ₄	0.01 g/l
K ₂ SO ₄	0.035 g/l
Sucrose	30.0 g/l
Eau distillée	1000ml

Cations (Chen et Strange, 1994) :

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 g /l
CuCl ₂ ·6H ₂ O	0.02 g /l
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.02 g /l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1 g /l
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.02 g /l

➤ Le milieu Richard (Kaiser, 1973) :

Saccharose	50g/l
KNO ₃	10g/l
KH ₂ PO ₄	2.5g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g/l
FeCl ₃	0.02g/l
Eau distillée	1000ml

➤ Extrait de pomme de terre (PDA) (Kaiser, 1973) :

Pomme de terre	200g
Glucose	20g
Eau distillée	1000ml

➤ **Extrait de Malt (Kaiser, 1973) :**

Extrait de Malt	25g
Agar	5g
Glucose	5g
Eau distillée	1000ml

➤ **Bouillon nutritif :**

Peptone	15g
Extrait de levure	5g
NaCl	5g
Eau distillée	1000ml