

## Table de matières

<b>Introduction</b>	1
<b>1.. Analyse bibliographique</b>	4
1. 1. Le pois chiche	4
1.1.1. Origine et domestication	4
1.1.2. Taxonomie	4
1.1.3. Caractéristiques botaniques de <i>Cicer arietinum</i> L	6
1.1.4. Importance du pois chiche	8
1.1.4.1. Importance économique	8
1.1.4.3. Importance écologique et agronomique	11
1.1.4.2. Valeur nutritive	11
1.1.5. Stress biotique et abiotique du pois chiche	12
1. 2. Étude de l'agent de l'antracnose du pois chiche <i>Ascochyta rabiei</i> (Pass.) Labr.	13
1.2.1. Historique	13
1.2.2. Taxonomie	14
1.2.3. Description du pathogène	14
1. 3. L'antracnose	16
1.3.1 Distribution et impact économique	16
1.3.2. Symptomatologie de l'antracnose	17
1.3.3. Les sources de l'infection, son développement et cycle de la maladie	17
1.3.4. Le processus infectieux et l'histopathologie de l'antracnose	20
1.4. La défense des plantes	22

1.4.1. Les défenses passives/constitutives	23
1.4.2. Les défenses actives	23
1.4.3. Voies métaboliques primaires des plantes et leur rôle dans la défense	27
1.4.3.1. Métabolisme des sucres	29
1.4.3.2. Métabolisme des acides Aminés	29
1.4.3.3. Métabolisme des lipides	29
1.4.4 .Mécanismes de défense du pois chiche <i>Cicer arietinum</i> L.	30
1.4.4.1. Les mécanismes constitutifs passifs	30
1.4.4.2. Mécanismes actifs, induits	31
1.5. Les méthodes de lutte	33
1.5.1 Méthodes culturales	33
1.5.2. La lutte chimique	34
1.5.3. La lutte biologique	34
1.5.4. La lutte génétique	35
1.6. Apport des biotechnologies à l'amélioration des plantes	36
1.7. La culture in vitro	37
1.8. Le criblage in vitro	37
1.9. Application de la culture in vitro pour l'amélioration du pois chiche	38
<b>2. Matériel et méthodes</b>	<b>39</b>
2.1. Le matériel végétal	39
2.2. Le matériel fongique	39

2.3. Culture du champignon	40
2.4. Préparation de la suspension de spore du pathogène	40
2.5. Test de pathogénicité du champignon	40
2.6. Obtention et maintien des cals hôtes	41
2.7. Analyse statistique	42
2.8. Préparation du pathosystème cal de <i>Cicer arietinum</i> /spores d' <i>Ascochyta rabiei</i>	42
2.9. Étude de la confrontation du pathosystème cal/ suspension de spores	43
2.10. Étude histologique des cals	43
Fixation	44
Déshydratation	44
Imprégnation	44
Inclusion finale dans la paraffine	44
Confection et collage des coupes	44
Déparaffinage et réhydratation des coupes	45
2.11. Coloration des coupes	45
2.11.1. Coloration au bleu de toluidine O	45
2.11.2. Localisation histochimique des phénols	46
2.11.3 Mise en évidence des flavonoïdes	46
2.12. Étude de l'effet de l'inoculation par la suspension de spores d' <i>Ascochyta rabiei</i> sur le profil biochimique des cals	46
2.12.1. Estimation quantitative des sucres solubles totaux	46
2.12.2. Estimation quantitative des protéines solubles totales	46
2.12.3. Estimation des polyphénols	47

2.12.4. Estimation des flavonoïdes	47
2.12. Analyse statistique	48
2.13. Étude qualitative des composés phénoliques des cals	48
2.14. Détection d'activité antifongique dans les extraits de cals par bioautographie directe	50
<b>3. Résultats</b>	<b>51</b>
3.1. Initiation de la callogenèse	51
3.1.1. Influence du génotype sur la callogenèse	60
3.1.2. Influence des régulateurs de croissance sur la callogenèse chez <i>Cicer arietinum</i> L.	61
3.1.3. Influence du type d'explant sur la callogenèse chez <i>Cicer arietinum</i> L.	62
3.2. Résultat du test de pathogénicité d' <i>Ascochyta rabiei</i>	63
3.3. Suivi macroscopique de l'interaction cals de <i>Cicer arietinum</i> / <i>Ascochyta rabiei</i>	64
3.4. Suivi microscopique de l'interaction cals de <i>Cicer arietinum</i> / <i>Ascochyta rabiei</i>	65
3.4.1. Étude Histologique des cals témoins	65
3.4.2. Étude histologique des cals inoculés	68
3.5. Localisation histochimique des phénols	73
3.6. Localisation histochimique des flavonoïdes	76
3.7. Études des modifications biochimiques	79
3.7.1. Évolution des protéines totales	80
3.7.2. Évolution des sucres solubles totaux	84
3.7.3. Évolution des composés phénoliques	88
3.7.4. Évolution des flavonoïdes	92

3.7.5. Corrélation entre les métabolites primaires et secondaires	96
3.8. Analyse qualitative des composés phénoliques des extraits de cals	97
3.9. La bioautographie directe par chromatographie sur couche mince CCM	105
<b>4. Discussion</b>	<b>108</b>
4.1. Initiation de la callogenèse	108
4.2. Histologie	111
4.3. Effet De l'inoculation Par La Suspension De Spores d'Ascochyta Rabiei Sur Le Profil Biochimique des Cals	115
4.5..Etude qualitative des composés phénoliques et bioautographie	122
<b>5. Conclusion générale et perspectives</b>	<b>124</b>
<b>6. Références bibliographiques</b>	<b>126</b>
Annexe	153

# Introduction

---

## Introduction

La sécurité alimentaire représente ces dernières décennies une des préoccupations majeures des politiques à l'échelle mondiale. La garantie des besoins nutritifs à des populations en croissance démographique exponentielle constitue un enjeu récurrent.

L'état des lieux établi en 2010 par l'organisation mondiale de l'agriculture et de l'alimentation (F.A.O) dresse un bilan alarmant sur la situation de la sécurité alimentaire dans le monde. Elle estime le nombre des personnes touchées par la famine à 1.02 milliard. Une prise de conscience de plus en plus importante s'instaure sur l'urgence d'agir pour garantir « une *alimentation suffisante sûre et nutritive pour les populations* ».

Bien que d'envergure mondiale, ce problème reste souvent focalisé dans les pays d'Afrique et d'Asie. Pour le surmonter, le concept de développement durable y est adopté. Il aspire à répondre aux besoins des générations actuelles et futures par l'exploitation et le renouvellement des ressources naturelles tout en préservant l'aspect écologique. En pratique ceci est intimement lié à l'établissement d'une agriculture écologique et durable capable de répondre à cet important enjeu.

Les légumineuses sont des cultures vivrières importantes pour la sécurité alimentaire de vastes tranches de populations. Selon l'Organisation des Nations Unies, "elles peuvent contribuer de manière significative à la sécurité alimentaire et à la santé humaine, ainsi qu'à la lutte contre la faim, la malnutrition et les défis environnementaux". Dans sa soixante-huitième assemblée générale, l'Organisation des Nations Unies, a proclamé 2016 Année Internationale des Légumineuses (AIL), afin de sensibiliser l'opinion publique à leurs avantages nutritionnels et attirer l'attention sur l'importance des légumineuses pour une production alimentaire durable et une sécurité alimentaire et nutritionnelle.

Le pois chiche est un protéagineux cultivé depuis longtemps dans le monde et vu sa valeur nutritionnelle, il occupe, pour de nombreux pays, une importante place dans l'alimentation humaine. Sa culture est constamment influencée par des contraintes abiotiques et biotiques dont l'anthraxose due à *Ascochyta rabiei* réduisant considérablement sa production. La lutte génétique reste la solution de choix, difficile à mettre en pratique étant donné l'inexistence de variétés résistantes à l'agent de l'anthraxose. Les méthodes de lutte utilisées contre cette maladie reposent essentiellement sur des mesures prophylactiques ou l'application de fongicides nuisibles pour la santé et l'écosystème. Actuellement, l'utilisation des pratiques de lutte respectueuses de l'environnement et de la santé publique et la réduction de l'usage des pesticides est une des composantes essentielles des objectifs de la durabilité des pratiques agricoles. La résolution de tels problèmes phytopathologiques rencontrés dans la pratique agronomique repose essentiellement sur une connaissance approfondie du pathosystème, d'où la nécessité d'étudier cette interaction pour éventuellement proposer de nouvelles stratégies de lutte contre ce champignon.

L'adoption de nouvelles alternatives révolutionnaires telle la « biotechnologie verte », peut apporter des moyens complémentaires pour et la sélection de variétés résistantes.

La culture de tissus *in vitro* est un moyen pour étudier les mécanismes physiologique et biochimique de la résistance des plantes aux pathogènes pouvant être appliqué dans l'interaction entre le pois chiche et *Ascochyta rabiei*, agent de l'anthraxose qui engendre des modifications métaboliques et histologiques chez l'hôte.

Dans cette optique, pour faciliter la sélection de clones résistants, ce travail tente d'étudier *in vitro* la réaction des cals issus de différents génotypes de pois

chiche, *Cicer arietinum* L. sensibles, résistants ou tolérants à *Ascochyta rabiei* Pass. Labr., agent de l'antracnose inoculés avec les spores du pathogène.

Dans un premier temps, un protocole d'initiation de la callogenèse à partir de différentes parties de la plante est établi pour produire des cals utilisés comme hôte. Ils sont ensuite inoculés avec une suspension de spores du pathogène. Le pathosystème ainsi préparé, est utilisé pour étudier l'interaction.

Une étude histologique des cals est menée pour suivre le processus infectieux par la localisation histochimique des composés phénoliques et des flavonoïdes impliqués dans la résistance.

L'impact de cette infection sur le métabolisme primaire et secondaire de l'hôte est évalué par l'étude quantitative des métabolites impliqués dans la résistance de l'hôte tels les sucres solubles totaux, les protéines totales, les polyphénols et les flavonoïdes, puis par une estimation semi-qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM) des composés phénoliques des extraits méthanoliques de cals. A partir des chromatogrammes, les fractions des extraits méthanoliques sont testées par biotaugraphie directement pour identifier l'activité fongitoxique sur l'agent pathogène.

# Analyse bibliographique

---

## 1. Analyse bibliographique

### 1. 1. Le pois chiche

#### 1.1.1. Origine et domestication

Les légumineuses appartiennent à la famille des Fabaceae, le deuxième grand ordre des plantes à fleurs les Fabales. Elles ont une grande importance économique et rentrent dans l'alimentation humaine (Sujatha *et al.*, 2007) et animale (Luc *et al.*, 1990), Ramalho Ribeiro et Portugal Melo, 1990).

Le pois chiche cultivé *Cicer arietinum* L. est la première légumineuse à grain domestiquée dans le monde antique (Hannan *et al.*, 2001). Il est identifié, en même temps que le blé et l'orge, comme partie intégrante de l'évolution de l'agriculture (Redden et Berger, 2007). Le pois chiche fait partie de l'agriculture pratiquée avant 10000 ans dans le croissant fertile (Pratab et Kumar, 2011) allant de l'ouest iranien vers le Sud-Est turque en passant par l'Irak, la Jordanie et la Palestine et fut développé pour répondre aux besoins nutritionnels humains (Redden et Berger, 2007). Selon les études paléo-ethnobotaniques, des matériaux extraits des fouilles archéologiques des sites des villages néolithiques, la Turquie serait probablement la zone pionnière dans la domestication du pois chiche 5450 avant JC (Hannan *et al.*, 2001). Plus tard il se propagea vers l'Inde, le moyen orient et les pays du bassin méditerranéen (Singh *et al.*, 2013).

Actuellement, il occupe le deuxième rang parmi les légumineuses consommées après la fève *Phaseolus vulgaris* L. (Gupta *et al.*, 2014).

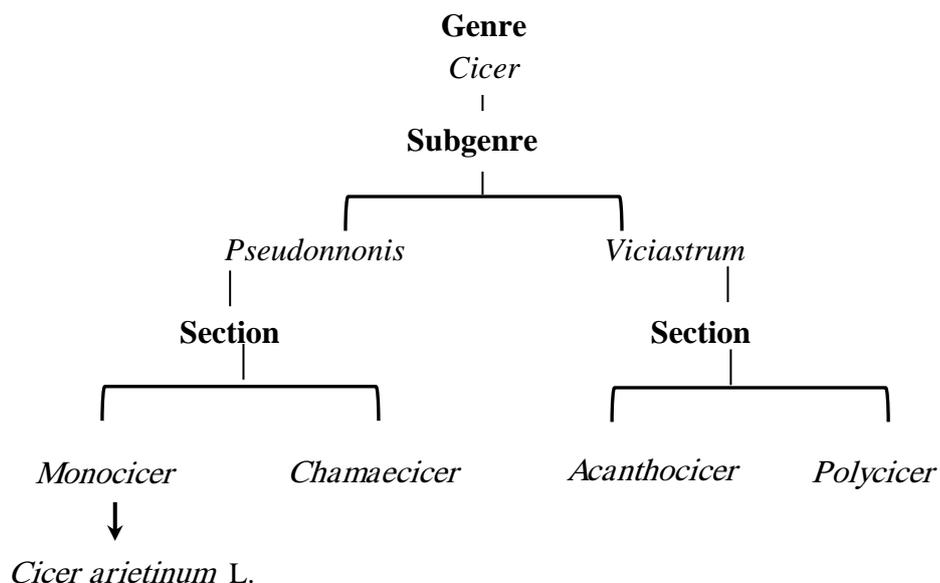
#### 1.1.2. Taxonomie

Le pois chiche cultivé *Cicer arietinum* est l'unique espèce domestiquée du genre *Cicer* (Kerem *et al.*, 2007), classé initialement sous la tribu des Viceae de la famille des Fabaceae, sous famille des Faboideae (Papilionodeae). En 1977, Kupicha présente une taxonomie détaillée avec les différences morphologiques entre *Cicer* et les autres genres de cette tribu. Depuis, il est classé sous la tribu monogénérique des Cicereae (Singh *et al.*, 2013).

La classification botanique du pois chiche est donnée dans le taxon suivant selon l'APG III (Bremer *et al.*, 2009):

<b>Règne</b>	Plantes
<b>Clade</b>	Angiospermes
<b>Clade</b>	Eudicotylédones
<b>Clade</b>	Core-Eudicot
<b>Clade</b>	Rosidés
<b>Clade</b>	Eurosides I
<b>Ordre</b>	Fabales
<b>Famille</b>	Fabaceae
<b>Sous famille</b>	Faboideae
<b>Tribu</b>	Cicereae AElf.
<b>Genre</b>	<i>Cicer</i>
<b>Nom binominal</b>	<i>Cicer arietinum</i>
Noms vernaculaires	Hommos (Arabe). Pois chiche (Français).

Le genre *Cicer* comprend 43 espèces dont 9 annuelles, 33 pérennes et 1 non spécifiée (Redden et Berger, 2007). Il se subdivise en deux sous genres et 4 sections selon leurs caractéristiques morphologiques, cycles de vie et distribution géographique (Singh et Jauhar, 2005).



Le nom de *Cicer arietinum* L. vient du latin *Cicero aries*, *cicero* en référence à une célèbre et noble famille romaine et *aries* ou tête de bélier par rapport à la forme de la graine de pois chiche (Rafiul Islam, 1991). Selon les régions, plusieurs noms communs sont utilisés pour désigner le pois chiche: Bengal gram (Inde), Garbanzo (Espagne), Chickpea, Egyptian pea (Angleterre) (Latif, 2002).

### 1.1.3. Caractéristiques botaniques de *Cicer arietinum* L.

C'est une plante autogame, diploïde avec  $2n = 16$  chromosomes, annuelle, herbacée, dressée à légèrement prostrée (Fig.1a), de 20 à 40 cm de hauteur, velue-glanduleuse et sans vrilles (Quezel et Santa, 1962).

La partie souterraine est constituée d'une racine pivotante ramifiée latéralement. Elle peut atteindre de 15 à 30 cm de profondeur (Pratap et Kumar, 2011). La partie aérienne est composée d'une tige quadrangulaire, verte, ramifiée portant des feuilles composées imparipennées de 6 à 8 paires de folioles. Elles sont de forme ovale, à contour denté en scie (Fig.1b) et mesurent de 8 à 17 mm de long sur 5 à 14 mm de largeur. Elles peuvent être opposées ou alternées, liées par le pétiole à un rachis qui mesure entre 3 à 7 cm de longueur (Singh et Diwakar, 1995).

Comme toutes les fabacées, le pois chiche présente des stipules (Quezel et Santa, 1962) de forme ovale à triangulaire et à contour denté. Elles ont 3 à 5 mm de long sur 2 à 4 mm de large (Singh et Diwakar, 1995).

La fleur du pois chiche est solitaire, bisexuelle de couleur blanche (Fig.1c), pourpre (Fig.1d), bleue ou mauve (Fig.1e) (Quezel et Santa, 1962) et a la constitution caractéristique des Faboidées avec 5 sépales, 5 pétales et 10 étamines dont neuf unis et le dixième libre (diadelphes) (Guignard et Dupont, 2004).

Le fruit, caractéristique de toute la famille des fabacées est une gousse ou légume qui renferme une à deux graines.

Le pois chiche est la seule plante connue dont la tige, les feuilles et les gousses vertes (Fig.1f) possèdent des trichomes ou poils glandulaires dont la fonction principale est de sécréter des acides organiques (Armstrong-cho et Gossen, 2005), essentiellement de l'acide malique (Ameziane El Hassani, 1981) et de l'acide oxalique. Ces sécrétions très acides dont le pH varie entre 0,4 -1,3, s'accumulent sur la surface des folioles et jouent probablement un rôle dans la défense de la plante contre les insectes (Armstrong-cho et Gossen, 2005).



**Figure 1.**Caractéristiques morphologiques du pois chiche *Cicer arietinum* L.

a : aspect général de la plante (a), aspect de la tige et des folioles du pois chiche (b), fleur pourpre(c), blanche (d),et mauve (e) du pois chiche, aspect de la gousse immature (f), types de graines Kabuli (g) et Desi (h) du pois chiche.

D'un point de vue pratique, le pois chiche est classé selon deux types Kabuli (Fig.1g) et Desi. (Fig.1h) Le premier est cultivé dans la région méditerranéenne, l'ouest de l'Asie, le nord de l'Afrique, l'Autriche, l'Amérique du nord. Il se caractérise par de grosses graines (macrosperma) blanches ou beiges de 0,2 à 0,6 g avec un tégument fin, des fleurs blanches et une tige non pigmentée. Le type Desi (microsperma) est à fleurs colorées, une tige pigmentée et des graines de 0,1 à 0,2.g dont le tégument est foncé. Sa culture est pratiquée essentiellement en Asie (Kumar *et al.*, 2012).

#### **1.1.4. Importance du pois chiche**

La culture et la commercialisation du pois chiche prend une dimension socio-économique de plus en plus importante vu les différents avantages et bienfaits qu'il offre (Broughton *et al.*, 2003).

##### **1.1.4.1. Importance économique**

Le pois chiche est une importante légumineuse consommée à travers le monde spécialement dans les pays Afro-asiatiques (Kumar *et al.*, 2012). Il est considéré comme un aliment de base dans plusieurs régions du monde en particulier dans les zones démunies ne pouvant pas avoir accès aux protéines animales (Sarker *et al.*, 2005) et dans les pays industrialisés il est également très prisé comme aliment de santé (Leterme, 2002).

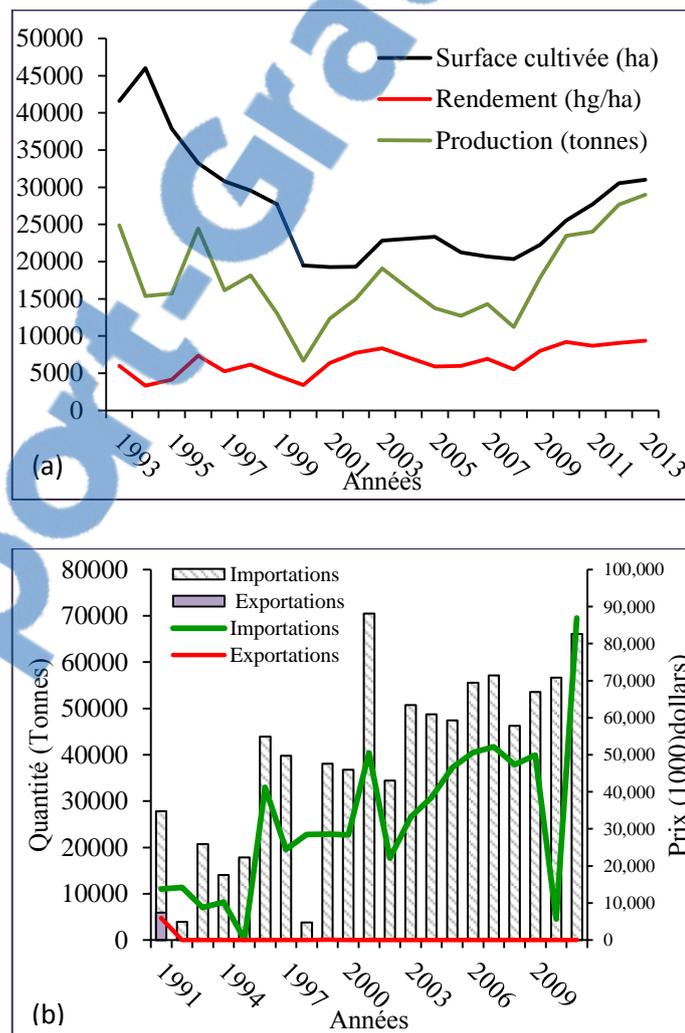
C'est une plante très cosmopolite cultivée dans 50 pays (Kumar *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2014) sur une superficie de plus de 13 millions ha avec une production moyenne de 13 118 698,83 tonnes (F.A.O, 2015). Le marché mondial du pois chiche connaît une continuelle croissance durant les dernières décennies. Selon les statistiques de la F.A.O., en moyenne 882 000 tonnes de pois chiche sont exportés chaque année soit une valeur approximative de 510 millions de dollars américains à travers le monde (Abate *et al.*, 2012).

L'Algérie, un des plus vastes pays d'Afrique où seulement 3.5% des terres sont consacrées à l'agriculture (Redden et berger, 2007), occupe la dix-septième place selon la superficie des terres cultivées en pois chiche et la quinzième en production (Tab.1). Cette culture est concentrée dans le nord du pays à 150 km de la côte méditerranéenne où se situent la plupart des terres érables (Maatougi *et al.*, 1996). Les deux dernières décennies 18 329 tonnes de pois chiche en moyenne sont produites sur 28 691,4 ha avec un rendement de 0.6 t/ha (Fig.2a).

**Tableau 1.** Surface des terres cultivées et production du pois chiche dans le monde (F.A.O, 2015)

<b>Rang</b>	<b>Pays</b>	<b>Surface cultivée (ha)</b>	<b>Production (tonnes)</b>
1	Pakistan	992 000,00	751 000,00
2	Népal	9 782,00	9 696,00
3	Inde	9 600 000,00	8 832 500,00
4	Syrie	84 500,00	57 500,00
5	Tunisie	8 050,00	7 700,00
6	Bangladesh	8 000,00	7 500,00
7	Soudan (ex)	7 498,00	13 654,00
8	Canada	72 000,00	169 400,00
9	Italie	6 797,00	10 090,00
10	Australie	573 600,00	813 300,00
11	Maroc	57 019,00	25 003,00
12	Iran	550 000,00	295 000,00
13	Turquie	423 557,00	50 6000,00
14	Espagne	35 000,00	22 000,00
15	Myanmar	335 000,00	490 000,00
16	Kazakhstan	31 800,00	14 700,00
<b>17</b>	<b>Algérie</b>	<b>31 000,00</b>	<b>29 000,00</b>
18	Fédération de Russie	23 800,00	47 000,00
19	Yémen	19 500,00	58 000,00
20	Bulgarie	1 282,00	1 302,00
21	Éthiopie	122 248,00	249 465,00
22	République-Unie de Tanzanie	120 000,00	120 000,00
23	Mexique	115 551,00	209 941,00
24	Malawi	115 000,00	67 000,00
25	Iraq	10 500,00	1 050,00
Monde		13 540 398,16	13 102 022,83
Afrique		483 485,00	530 952,00
Afrique du Nord		106 117,00	80 297,00

Cette production est très insuffisante et incapable de couvrir la demande nationale. la sécheresse, les faibles précipitations la salinité et les maladies sont les plus importants facteurs qui affectent la production agricole (Maatougi *et al.*, 1996). Ces dernières décennies, la surface cultivée en pois chiche a diminué (Fig.2a) malgré le prix rémunérateur encourageant appliqué par les coopératives, 3000 DA/quintal presque équivalent à celui du blé tendre, 3500DA/quintal (Agence Nationale de Développement de l'Investissement). L'importation du pois chiche est inévitable pour garantir sa disponibilité sur le marché intérieur malgré la hausse des prix sur le marché (Fig.2b). Le rapport du CIHEAM (centre international des hautes cultures méditerranéennes) parut en 2008, montre que la production nationale de pois chiche durant la décennie 1995-2005 couvrait seulement 27,7% de la demande (Bedrani, 2008). L'Algérie importe chaque année, en moyenne, plus de 38 millions dollars en pois chiche (Faostat, 2015), soit 6.6% des importations (Dusunceli *et al.*, 2007).



**Figure 2.** Surface, rendement, production (a), importations et exportations (b) du pois chiche en Algérie (Faostat, 2015)

#### 1.1.4.2. Valeur nutritive

Comme toutes les légumineuses, le pois chiche est cultivé pour la haute valeur nutritive de ses graines et fait partie depuis les anciennes civilisations des composants diététiques (Pratap et Kumar, 2011). Le pois chiche est un excellent aliment vu sa composition chimique. C'est une source importante de protéines végétales (23g par 100g de graines), le double de ce que peuvent offrir les céréales et plus que ce que l'on trouve dans la viande (Baumgartner, 1998). Il compte également 64% de carbohydrates, 47% d'amidon, 5% d'acide gras principalement l'acide linoléique et oléique. Sa composition minérale est riche en phosphore (343 mg/100mg), calcium (186 mg/100g), magnésium (141mg/100g), fer (7mg/100g) et du zinc (3mg/100g) (Pratap et Kumar, 2011).

L'industrialisation, l'urbanisation et la globalisation des marchés de nourriture a favorisé la recrudescence de maladies chroniques liées à une alimentation déséquilibrée telle l'obésité et le diabète. Différentes recherches ont démontré l'effet bénéfique des légumineuses sur la prévention et aussi le traitement de plusieurs maladies (Redden et Berger, 2007). Le pois chiche est très apprécié comme aliment de santé surtout dans les pays développés vu sa faible teneur en matières grasses et sa richesse en fibres (Baumgartner, 1998) et maintenant, il est établi que sa consommation régulière améliore la santé. En effet, il convient au régime alimentaire pour les patients souffrant de maladies coronariennes et cardiovasculaires et aux diabétiques du type 2 (Trinidad *et al.*, 2010). Il contrôle le taux de cholestérol et la tension artérielle (Jukanti *et al.*, 2012) et couvre largement les besoins nutritifs en acides aminés de l'homme adulte et de l'enfant selon les normes données en 1985 par la F.A.O (Mansour, 1996). C'est le cas du tryptophane (1,2 %), un acide aminé précurseur de la sérotonine. Cette molécule cérébrale régite le sommeil, les performances cognitives et a une influence particulière sur la mémoire (Kerem *et al.*, 2007).

Il renferme également une multitude de vitamines hydrosolubles (Huda *et al.*, 2003) comme la biotine qui est un cofacteur essentiel aux carboxylases et décarboxylases, enzymes clés de la majorité des cycles métaboliques (Broughton *et al.*, 2003). Il contient des minéraux comme le fer, le potassium, le calcium, le magnésium et des oligoéléments (Huda *et al.*, 2003). Ceci fait de lui un aliment équivalent au poisson ou à la viande bovine, surtout s'il est associé aux céréales (Ali *et al.*, 2008).

#### 1.1.4.3. Importance écologique et agronomique

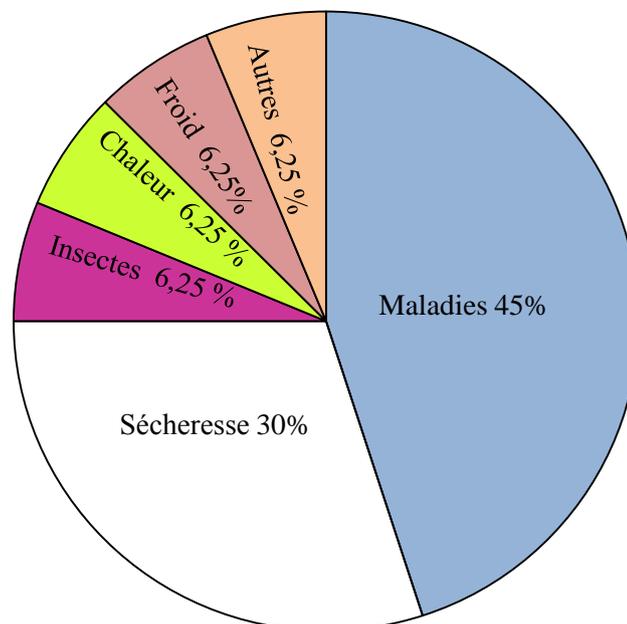
Le pois chiche est capable de fixer 80% de l'azote qui lui est nécessaire (Singh et Jauhar, 2005) grâce à une relation symbiotique avec *Mesorhizobium ciceri* (Esfahani *et al.*, 2014). Il permet de fixer plus de 140 kg N/ha et améliore la santé du sol, sa fertilité et la durabilité de l'écosystème

par la production de matière organique et de l'azote résiduel (Singh et Jauhar, 2005). Il participe à fertiliser les sols pauvres, particulièrement dans les zones arides (Saxena, 1990) et les terres marginales en Afrique et en Asie (Jamil *et al.*, 2010). La culture du pois chiche est pratiquée en rotation avec le maïs ou le blé (Gupta *et al.*, 2014) dans les zones arides et semi-arides (Winch, 2006), les terres sablonneuses non irriguées (Jamil *et al.*, 2010) et dans les pays développés comme l'Australie et le Canada (Singh et Jauhar, 2005).

D'un autre côté, selon Tawaha *et al.*, (2005), le pois chiche ne nécessite pas un grand taux de phosphate, ce qui lui permet de croître sur les sols calcaires, très répandus dans les pays méditerranéens. Il permet en conséquence de réduire l'utilisation des engrais chimiques, onéreux et néfastes pour l'environnement (David et Khan, 2001).

### 1.1.5. Stress biotique et abiotique du pois chiche

La culture de pois chiche est influencée par différents facteurs abiotiques et biotiques (Fig.3) qui diminuent considérablement sa production (Sant, 2001).



**Figure 3.** Répartition des principales contraintes biotiques et abiotiques de la culture de pois chiche (Sant, 2001)

Jusqu'en 1978, 49 pathogènes étaient répertoriés à travers 35 pays. En 1995, le nombre de pathogènes atteint 172 à travers 55 pays dont 67 espèces fongiques, 3 bactériennes, 22 virus et mycoplasmes et 80 nématodes (Pande *et al.*, 2010 b) mais seulement quelques-uns causent des dégâts considérables. C'est le cas du flétrissement dû à *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*, la pourriture sèche des racines causée par *Rhizoctonia bataticola* (Zikara-Zine, 2003).

L'antracnose due à *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. est de loin la plus dangereuse des maladies qui touchent le pois chiche (Ameziane El Hassani, 1981; Akem, 1999; Shah *et al.*, 2005). Elle affecte la récolte dans la qualité et la quantité des graines (Gan *et al.*, 2006 ; Muehlbauer et Chen, 2007) et sous des conditions épidémiques (forte humidité, vent et pluies), les pertes peuvent être totales en trois semaines (Iqbal *et al.*, 2005). Déjà en 1911, Buttler rapporta les pertes sérieuses occasionnées par ce champignon parasite en Inde et depuis, une épidémie est enregistrée périodiquement dans plus de 40 pays à travers le monde (Shahid, 2004 ; Bhardwaj *et al.*, 2010).

## 1.2. Étude de l'agent de l'antracnose du pois chiche *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.

### 1.2.1. Historique

*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. (Teleomorphe *Didymella rabiei* (Kovachevski) Von Arx. synonyme *Mycosphaerella rabiei* (Kovachevski) est le champignon agent de l'antracnose du pois chiche (Vail, 2005). Il regroupe dans son cycle biologique deux stades de sporulation distincts; sexué et asexué. Selon Dickinson (2003), c'est le cas chez la plupart des champignons imparfaits, ils sont dit pléomorphiques d'où cette complexité dans la nomenclature (Dickinson, 2003). Ces deux stades appelés anamorphe et téléomorphe ont été découverts et décrits dans des périodes différentes et ont par conséquent reçus des noms différents et ce n'est que beaucoup plus tard que la relation entre eux fut établie (Lepoivre, 2003).

**Le stade anamorphe** [du grec ana = similaire ou analogue et morphe = forme (Webster et weber, 2007)], est issu d'une reproduction asexuée. Sous cette forme le champignon est désigné sous le nom d'*Ascochyta rabiei* et est classé dans la grande classe des Deutéromycètes ou champignons mitosporiques vu que les spores ne sont produites qu'asexuellement, par mitose (Agrios, 2005). Cette forme très répandue dans la nature (Porta Puglia, 1990) est connue depuis longtemps (Akem, 1999). Elle a été étudiée en 1867 par le français Passerini qui l'appela *Zythia rabiei* en se basant sur les spores unicellulaires et hyalines. En 1893, Prilleux et Delacroix suggérèrent le nom de *Phyllosticta cicerin* (Vail, 2005) puis en 1918, Trotter proposa le nom de *Phyllosticta rabiei* (Pass.) vu la présence de quelques spores bicellulaires. Entre 1930 et 1931, Labrousse confirma la présence de ces spores bicellulaires et précisa que leur taux varie entre 2 à 4 % du nombre total des spores. Malgré la divergence dans l'opinion des taxonomistes, la majorité a adopté celui d'*Ascochyta rabiei* (Porta-Puglia, 1990) qui appartient à l'un des plus grands genres de Deutéromycètes, *Ascochyta*, décrit par Libert en 1830 (Mel'nik, 2000).

**Le stade téléomorphe** {du grec teleos ou teles = parfait (Webster Weber, 2007)] est issu de reproduction sexuée. Sous cette forme, le champignon appelé *Didymella rabiei* est classé parmi les Ascomycètes vu que les spores sont produites dans des asques.

Cette forme moins répandue dans la nature a été découverte pour la première fois en 1936 par Kovachevski en Bulgarie qui lui donna le nom de *Mycosphaerella rabiei* puis Von Arx la transféra dans le genre *Didymella* en se basant sur la structure des ascospores, leur taille et la taille du pseudothèce (Vail, 2005; Peever *et al.*, 2007). Ce stade est dit hétérothallique et apparaît par la conjugaison de deux thalles compatibles (Bayraktar *et al.*, 2007).

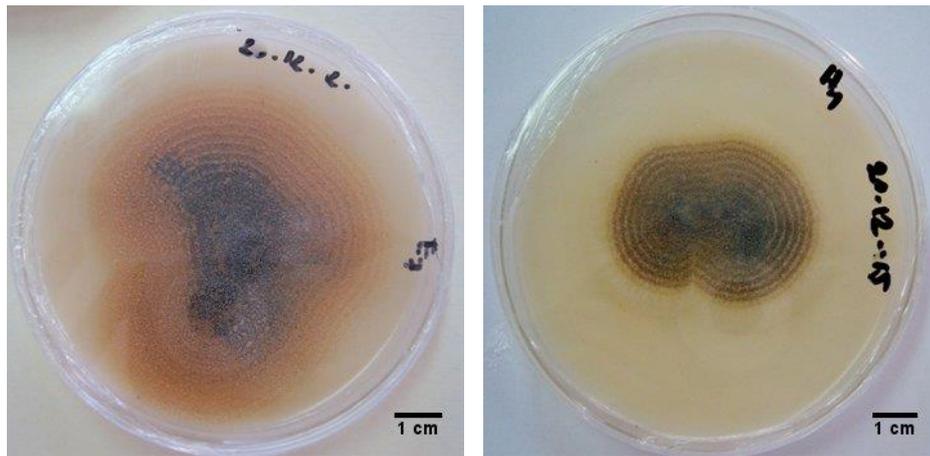
### 1.2.2. Taxonomie

La classification des deux formes de l'agent de l'antracnose du pois chiche *Cicer arietinum* L. sont données selon les taxons suivants :

	Forme asexuée <i>Ascochyta rabiei</i> (Barnett et Hunter, 1998)	Forme sexuée <i>Didymella rabiei</i> (Alexopoulos <i>et al.</i> , 1996)
<b>Règne</b>	Mycètes	Mycètes
<b>Division</b>	Eumycetes	Eumycetes
<b>Subdivision</b>	Deuteromycetes	Ascomycetes
<b>Classe</b>	Coelomycetes	Loculoascomycetes
<b>Ordre</b>	Sphaeropsidales	Dothidiales
<b>Famille</b>	Sphaeropsidacées	Dothidiacées
<b>Genre</b>	<i>Ascochyta</i>	<i>Didymella</i>
<b>Nom binominal</b>	<i>Ascochyta rabiei</i>	<i>Didymella rabiei</i>

### 1.2.3. Description du pathogène

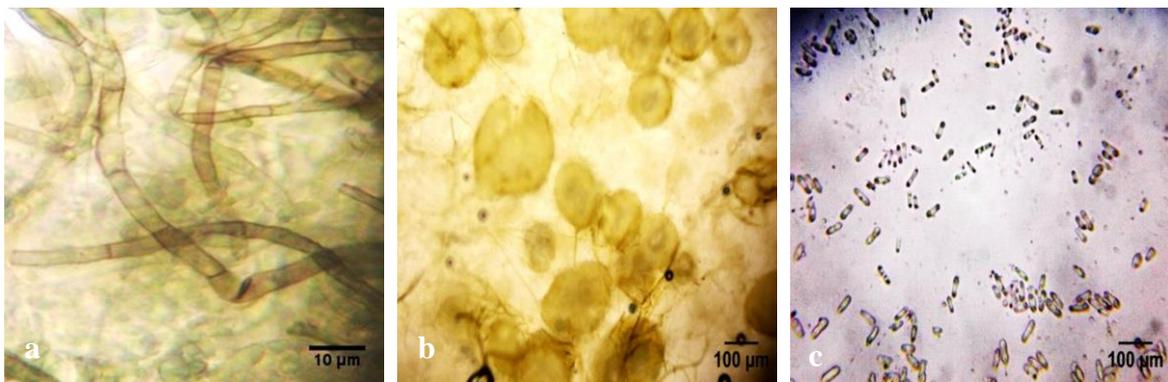
*Ascochyta rabiei* se développe sur divers milieux artificiels (Kaiser, 1997; Ali *et al.*, 2009 a) et présente une variabilité phénotypique au niveau de la croissance radiale et de l'aspect des colonies (Bruns et Barz, 2001; Ali *et al.*, 2009 b). Elles sont plates, à croissance lente, au début blanches puis, après 3 à 4 jours, avec la formation des pycnides prennent des teintes variant entre le marron, le noir (Khan *et al.*, 1999), le vert ou le gris (Basandrai *et al.*, 2005). Sous l'effet de la photopériode, elles forment des secteurs cultureux ou zonations constituées de cercles foncés alternés avec d'autres plus clairs (Fig.4). L'abondance des pycnides et du cirrhe donne à la colonie un aspect humide.



**Figure 4.** Aspect macroscopique des colonies d'*Ascochyta rabiei* sur le milieu de culture de pois chiche

Le mycélium est septé (Fig.5 a) et hyalin. Les organes de reproduction asexuée du stade anamorphe sont des pycnides marron ou à noire selon leur degré de maturité (Fig.5b). Elles sont globuleuses à lentiformes, très agrégées, immergées dans le substrat *in vitro* et sous épidermiques dans le tissu de l'hôte (Mel'nik, 2000). Elles mesurent 100 à 260  $\mu\text{m}$  sur 160 à 180  $\mu\text{m}$  (Sharma et Ghosh, 2016). Le peridium est constitué d'une à deux couches de cellules pseudo parenchymateuses isodiamétriques à paroi fine de 8 à 10  $\mu\text{m}$  sur 12 à 15  $\mu\text{m}$  (Mel'nik, 2000).

A partir des cellules internes de ces pycnides se forme des conidies ou pycnidiospores. Elles sont hyalines de forme cylindrique, ellipsoïdale ou ovale à oblongue (Vail, 2005). Elles peuvent être incurvées à une ou aux deux extrémités (Chandirasekaran, 2007) et occasionnellement bicellulaires (Fig.5c) (Sharma et Ghosh, 2016). Les conidies sont libérées de la pycnide à travers un pore ou ostiole saillant plus ou moins régulier d'un diamètre de 20 à 25  $\mu\text{m}$  dans un cirrhe épais crème à rosâtre (Mel'nik, 2000). Des variations dans la taille des pycnides, des conidies peuvent être observées sur des substrats différents ou chez des isolats différents (Sharma et Ghosh, 2016).



**Figure 5.** Mycélium hyalin et septé (a), pycnides (b), spores hyalines (c)



Les prospections entreprises révèlent la présence de foyers de la maladie et son extension pouvant mener à la perte totale de la culture. C'est la plus dévastatrice des maladies qui touchent le pois chiche surtout que les cultivars locaux sont hautement sensibles à ce champignon (Benzohra *et al.*, 2015).

### 1.3.2. Symptomatologie de l'antracnose

L'antracnose est une maladie transmise par la graine et se propage à travers les débris. Elle est remarquée au moment de la floraison et la formation de gousses, sous forme de patches de plantes nécrosées dans le champ (Pande *et al.*, 2010b) cependant, elle peut aussi se déclarer très tôt si les conditions climatiques sont favorables. Selon Akem (1999), l'humidité relative proche de 100% durant au moins six heures (Trapero-Casas et Kaiser, 1992) est nécessaire à l'apparition et la propagation de la maladie. La température est aussi un facteur très décisif pour l'infection. Elle doit être comprise entre 18 et 28°C (Trapero-Casas *et al.*, 1996), les valeurs extrêmes inhibent la croissance du pathogène (Höhl *et al.*, 1990) sauf si les périodes d'humidité sont longues (Trapero-Casas et Kaiser, 1992).

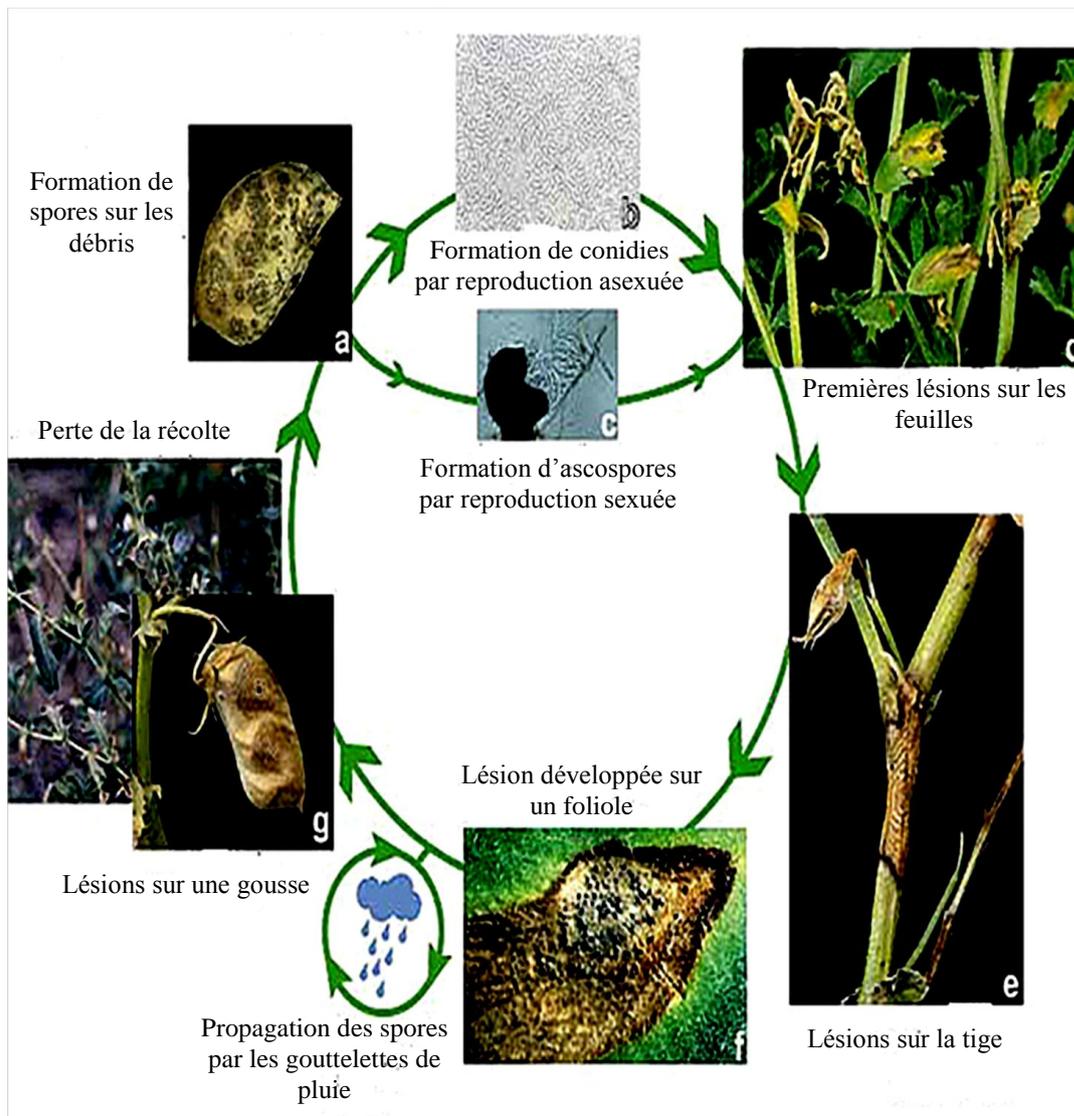
L'ascochytose est une maladie initialement foliaire, puis gagne toutes les parties aériennes de la plante. Les premiers symptômes apparaissent sur les feuilles supérieures sous forme de gouttelettes d'eau (Pande *et al.*, 2010b) qui se transforment en tâches ou lésions grisâtres puis virent au brun et apparaissent ensuite entourées par des bordures noires. Plus tard, ces taches se propagent sur toute la partie aérienne de la plante, pétioles, fleurs, gousses et tiges (Pande *et al.*, 2010b). Des pycnides se développent dans le centre des lésions et s'arrangent en cercles concentriques caractéristiques de l'antracnose (Markell *et al.*, 2008). Les mêmes nécroses concentriques apparaissent sur les gousses. Elles ont 0,5 cm de diamètre (Nene et Reddy, 1987) et les pycnides y sont facilement observables. Lorsque l'attaque est sévère, les graines sont infectées et paraissent décolorées et ratatinées (Markell *et al.*, 2008). Sur les tiges et pétioles, les lésions sont brunes allongées de 3 à 4 cm (Nene et Reddy, 1987) avec des pycnides noires. Les nécroses entourent le point d'infection et la tige finit par se casser (Vail, 2005).

### 1.3.3. Les sources de l'infection, son développement et cycle de la maladie

L'antracnose du pois chiche est une maladie transmise par les graines et se propage à travers les débris (Pande *et al.*, 2010 b). Elle est polycyclique où se succèdent par saison, cinq à dix générations de pycnidiospores issues de stade anamorphe (Tivoli et Banniza, 2007) et une seule génération d'ascospores fruits du stade téléomorphe (Fig. 7) (Peever *et al.*, 2004).

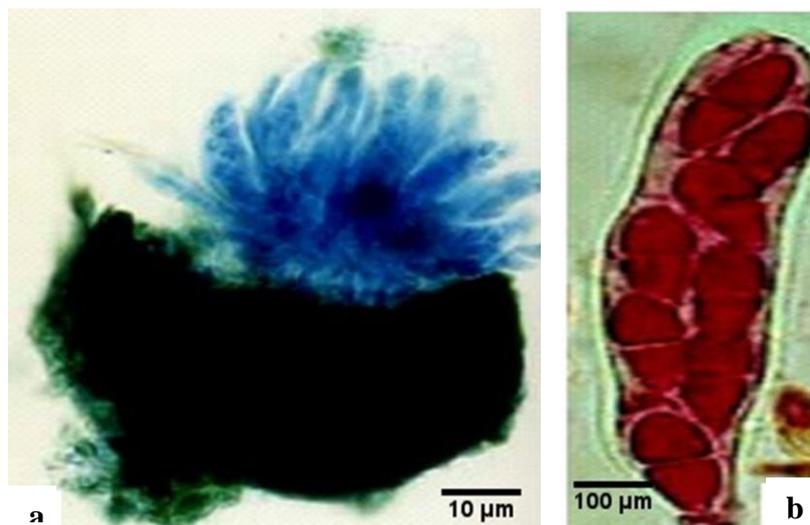
Le développement de la maladie peut être considéré comme une compétition entre la plante hôte, sa vitesse de croissance et le pathogène qui doit l'infecter. Au début, la maladie touche, durant l'hiver, quelques plantules (Tivoli et Banniza, 2007), une fois le pathogène établi, les conidies formées dans les pycnides deviennent une source de contamination à l'origine des cycles épidémiques secondaires. Aidées par les éclaboussures de pluies, ces conidies propagent le pathogène au sein d'une même plante puis d'une plante à une autre (Shtienberg *et al.*, 2005). La maladie s'accroît favorisée par le ralentissement de la croissance de la plante (Tivoli et Banniza, 2007).

Les principales sources à l'origine de l'initiation de la maladie ou source de l'inoculum primaire sont les graines infectées, les débris laissés après la récolte et le vent (Singh et Reddy, 1990; Rhaiem et Cherif, 2006; Chongo *et al.*, 2004).



**Figure 7.** Cycle de vie de l'antracnose de pois chiche (Dokken-Bouchard *et al.*, 2010)

Les graines infectées sont la plus importante source de pathogène et causent l'introduction de l'antracnose dans des zones jusque-là indemnes (Kaiser, 1997). Les mouvements des semences infectées contribuent aussi à l'apparition du stade téléomorphe par l'introduction de thalles compatibles dans de nouvelles zones (Dey et Singh, 1994; Tivoli et Banniza, 2007). Le pathogène est capable de survivre durant quelques années sur et dans les graines grâce à son aptitude à pénétrer dans ses parties internes, le plus souvent dans les téguments et rarement dans les cotylédons ou l'embryon surtout si elles sont stockées à de basses températures (Tivoli et Banniza, 2007).



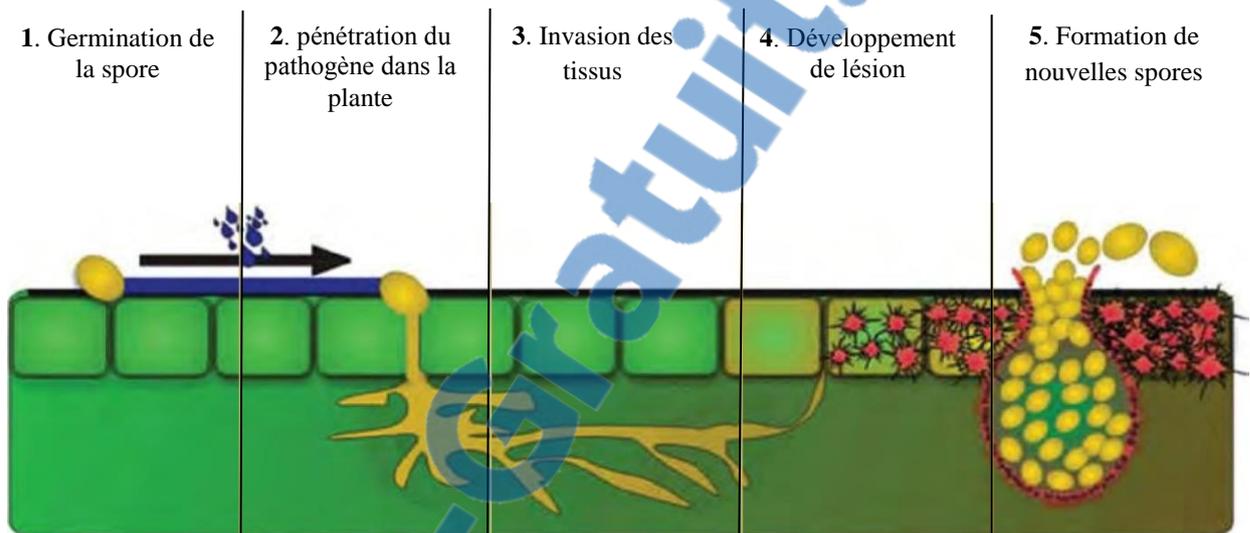
**Figure 8.** Pseudothèce avec asque (a); asque bituniqué avec huit ascospores (b) (Rhaïem et Cherif, 2006).

Le chaume et les débris laissés après la récolte pour prévenir l'érosion des sols notamment dans les pays méditerranéens (Navas-Cortes *et al.*, 1995) constituent un foyer d'inoculum primaire pour les pycnidiospores produites en grand nombre et qui sont responsables de l'infection secondaire surtout si les rotations entre les cultures de pois chiche sont courtes ou inexistantes (Shtienberg *et al.*, 2005). C'est aussi un lieu de prédilection où se développent les pseudothèces (Fig. 8a) qui renferment des ascospores bicellulaires (Fig. 8b) dont le nombre peut atteindre 15000 par mm<sup>2</sup> de la surface des tissus de chaume infecté (Navas-Cortes *et al.*, 1998).

La formation des pseudothèces débute avec les premières pluies d'automne et continue pendant tout l'hiver. (Kaiser et Küsmenoglu., 1997). Arrivées à maturité, les pseudothèces libèrent les ascospores qui sont propagées par le vent (Gamliel-Atinsky *et al.*, 2005) à de longues distances dépassant 8 kilomètres (Shtienberg *et al.*, 2005) et les pseudothèces vidés, dégèrent (Gamliel-Atinsky *et al.*, 2005).

### 1.3.4. Le processus infectieux et l'histopathologie de l'antracnose

*Ascochyta rabiei* (téléomorphe *Didymella rabiei*) est un champignon nécrotrophe à pénétration directe (Jayakumar *et al.*, 2005). L'infection débute 12 à 14 heures après l'inoculation (Höhl *et al.*, 1990). Les spores germent, s'allongent et forment sur la surface des folioles des tubes germinatifs polaires (Fig. 9) (Tivoli et Banniza, 2007). Ces derniers secrètent une substance mucilagineuse qui va leur permettre une meilleure adhésion aux cellules de l'hôte (Höhl *et al.*, 1990) et les protègent de la dessiccation (Jayakumar *et al.*, 2005).



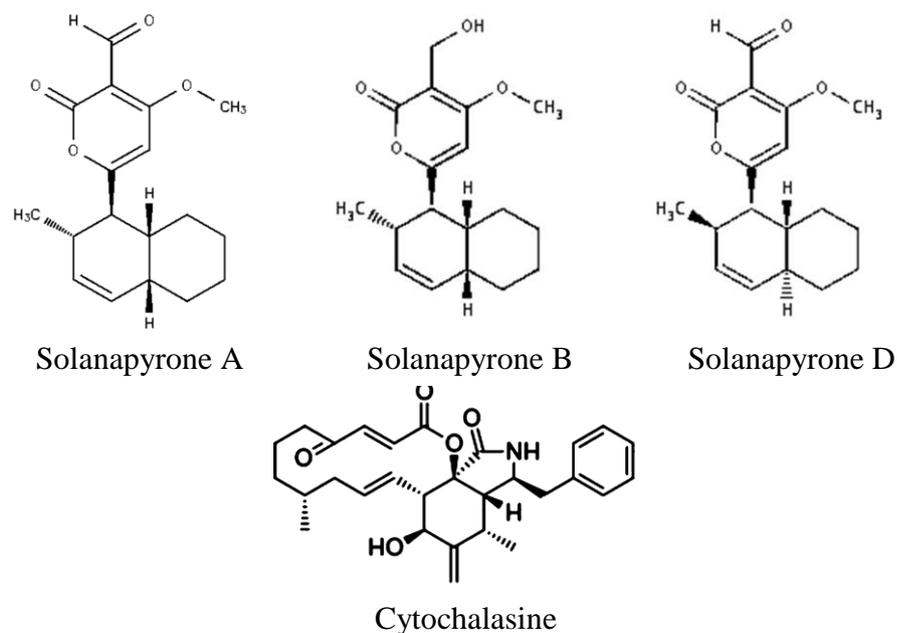
**Figure 9.** Processus infectieux d'*Ascochyta rabiei* (Dokken-Bouchard *et al.*, 2010)

L'extrémité du tube germinatif différencie une structure spécialisée appelée l'appressorium qui est le moyen de pénétration et de colonisation des tissus de l'hôte en formant un hyphes d'infection (Duhoux *et al.*, 2004). *Ascochyta rabiei* pénètre directement dans les 24 heures qui suivent l'inoculation par force mécanique à travers la cuticule entre deux cellules épidermiques (Fischer *et al.*, 1995) et rarement à travers les stomates (Höhl *et al.*, 1990). L'appressorium est non mélanisé ce qui mène à penser que la pénétration ne se fait pas uniquement par la force mécanique. En effet ce pathogène est capable de produire une panoplie d'enzymes hydrolytiques comme les xylanases, les exopolysaccharidases et les cutinases qui dégradent la paroi végétale et facilitent l'infection de l'hôte (Höhl *et al.*, 1990).

Les hyphes se propagent en parallèle entre les cellules épidermiques et celles du parenchyme palissadique perturbant la structure interne des folioles (Pande *et al.*, 2005) dans l'espace intercellulaire (Köhler *et al.*, 1995) et sont liées par la même substance mucilagineuse produite au début de l'infection. Jusqu'à ce stade la structure des folioles est encore intacte, les parenchymes

palissadique et lacuneux sont encore distinguables (Höhl *et al.*, 1990) jusqu'à la colonisation totale de l'espace intercellulaire où les tissus commencent par se désintégrer (Fischer *et al.*, 1995)

L'infection de la tige se fait soit par la pénétration du pathogène directement à travers la cuticule ou par la propagation des hyphes à partir des tissus foliaires. En effet, le champignon se propage dans la lamelle moyenne des tissus parenchymateux du foliole pour atteindre le pétiole puis la tige (Jayakumar *et al.*, 2005) où il colonise essentiellement le phloème et les parenchymes (Köhler *et al.*, 1995). Les tissus lignifiés particulièrement les trachéides, sont partiellement endommagés mais gardent leurs structures (Jayakumar *et al.*, 2005). Vers le huitième jour de l'infection, les hyphes commencent à former des pycnides près des vaisseaux qui deviennent après la destruction des autres cellules un support pour leur développement (Köhler *et al.*, 1995). Les pycnides mûres arrangées en anneaux circulaires apparaissent sur les tissus de l'hôte donnant les lésions nécrotiques typiques de l'antracnose (Fischer *et al.*, 1995). La nature nécrotrophique d'*Ascochyta rabiei* est essentiellement due à la sécrétion de substances toxiques ou phytotoxines de trois types de solanapyrones A, B, C; cytochalasine D (Fig. 10) (Latif *et al.*, 1993) et une phytotoxine de nature protéique (Jayakumar *et al.*, 2005).



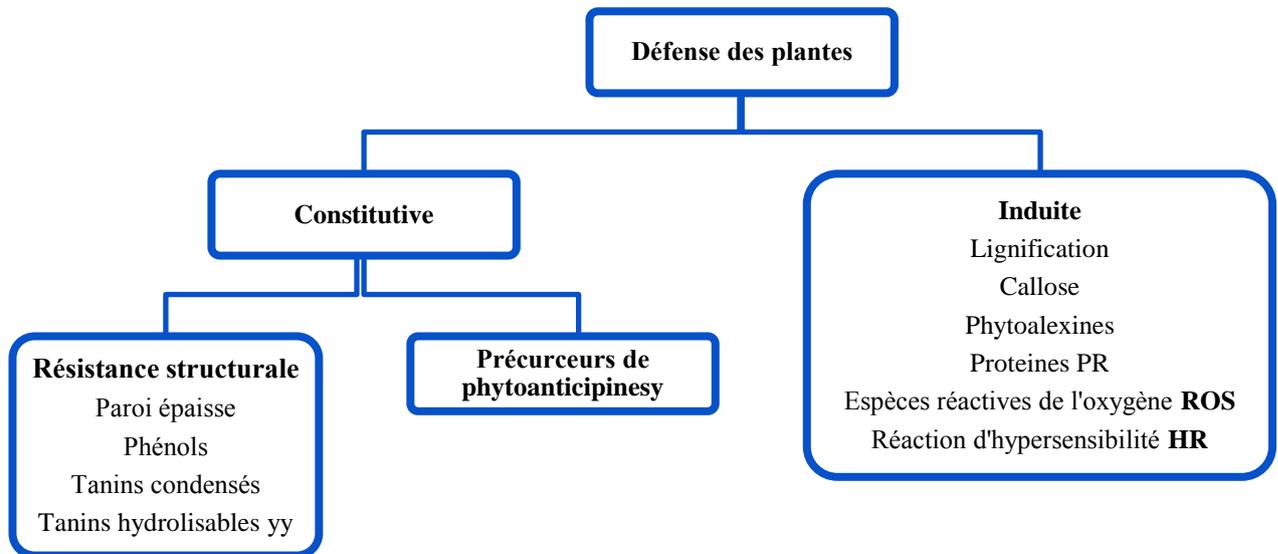
**Figure 10.** Structure chimique des solanapyrones A, B et C d'*Ascochyta rabiei* (Strange, 2003) et Cytochalasine (Muria-Gonzalez *et al.*, 2015)

La production de ces phytotoxines par *Ascochyta rabiei* dépend des nutriments, les solanapyrones A, B et C sont produites seulement sur un milieu artificiel supplémenté d'extrait de pois chiche. L'ajout des cations métalliques ( $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) au milieu Czapeck Dox en concentrations égales à celles contenues dans l'extrait de pois chiche est nécessaire à la croissance d'*Ascochyta rabiei* et la production des toxines (Chen et Strange, 1994). Étant donné que ces toxines sont synthétisées dans les milieux qui contiennent l'extrait de pois chiche, elles sont probablement produites dans les plantes infectées. Cependant seule la solanapyrone C a pu être détectée dans les tissus des plantes. L'absence des autres toxines est peut être due à leur faible concentration *in vivo* et/ou leur transformation rapide (Jayakumar *et al.*, 2005). Toutefois leur rôle dans la pathogénicité n'est pas connu excepté pour les solanapyrones qui semble ne pas être indispensable à la pathogenèse puisque la virulence de mutants incapables de produire cette toxine reste inchangée (Fondevilla, 2015).

#### 1.4. La défense des plantes

Les plantes sont au cours de leur vie en constante interaction avec leur environnement et sont confrontées à différents types de stress. La relation hôte-parasite est un équilibre entre l'aptitude de l'agent pathogène à envahir la plante et les mécanismes de défense mis en place par cette dernière. Durant la co-évolution entre les végétaux et leurs agresseurs, les moyens de défense développés sont très diversifiés. L'interaction est qualifiée d'**incompatible** et la plante est dite **résistante**. Si ces défenses sont déclenchées trop tard ou bloquées par l'agresseur, elles seront inefficaces. L'interaction est alors dite **compatible** et la plante est **sensible** (Hopkins, 2003).

Bien que dépourvue de cellules immunitaires spécialisées, les plantes peuvent se défendre contre les agents pathogènes en déclenchant des mécanismes de défense capables de détecter les microorganismes envahisseurs et arrêter l'infection (Abad et Favery, 2012). Ils peuvent être constitutifs innés ou induits (Fig.11).



**Figure 11.** La défense des plantes

#### 1.4.1. Les défenses passives/constitutives

La première ligne de défense est l'ensemble de barrières physiques structurales: paroi, poils, cuticule, épiderme. Cette première barrière naturelle est donc déjà très sélective et interagit avec les mécanismes de défense induits (Gabler *et al.*, 2003).

Au niveau des cellules et des parois, des barrières chimiques sont mises en place. Ainsi des polyphénols, molécules antimicrobiennes, peuvent s'accumuler dans les vacuoles et imprégner les parois. Certains microorganismes parviennent à les franchir et pénètrent par les ouvertures naturelles, les blessures ou *via* l'action d'enzymes de l'agresseur (Abad et Favery, 2012).

#### 1.4.2. Les défenses actives

Lorsqu'un agent pathogène contourne les défenses passives de la plante, elle met rapidement en place des mécanismes plus localisés et plus spécifiques au pathogène. Ce type de défense se déroule en trois phases : la reconnaissance, la signalisation et la défense (Fig. 13).

##### ***La reconnaissance***

La plante reconnaît le pathogène grâce à des récepteurs qui détectent des motifs appelés éliciteurs. Ils peuvent être exogènes et proviennent de l'agent pathogène ou endogènes, issus de la dégradation des tissus de la plante par le parasite. Ces molécules sont appelées **MAMP** pour «*Microbe Associated Molecular Pattern*» ou **PAMP** pour «*Pathogen Associated Molecular Pattern*», reconnues par des récepteurs appelés **PRR** pour «*Pattern Recognition Receptor*» (Zipfel, 2008). La réponse déclenchée par cette reconnaissance correspond à **un niveau basal de**

**défense** qui permet de protéger la plante contre un organisme non hôte ou de restreindre, mais pas d'empêcher, le développement d'un organisme hôte. Ce type de reconnaissance est associé au phénomène de résistance systémique. Cette **résistance basale**, ou **PTI** (*PAMP-Triggered Immunity*), non spécifique est déclenchée par la reconnaissance de molécules de réactions de défense appelées communément éliciteurs, PAMP ou MAMP.

Les éliciteurs sont de nature chimique variée: peptidique, lipidique ou oligosaccharidique (Nürnberger *et al.*, 2004 ; Boller et Felix, 2009). Ils incluent des molécules d'origine microbienne, en particulier des constituants structuraux, mais également d'origine végétale issues de la dégradation des parois par des enzymes hydrolytiques libérées par le pathogène ou l'hôte et appelés **DAMP** (*Damage-Associated Molecular Patterns*) (Boller et Felix, 2009).

La PTI constitue un premier niveau de défense. Cependant, certains pathogènes parviennent à contourner la PTI *via* la production d'effecteurs codés par des gènes d'avirulence (**Avr**) qui interfèrent directement avec le processus de reconnaissance ou bloquent les étapes de signalisation et déclenchent la maladie (Abad et Favery, 2012).

### ***La signalisation***

La reconnaissance de l'éliciteur est immédiatement suivie d'une cascade de mécanismes qui vont permettre la transmission de l'information au sein de la cellule, puis de toute la plante. Elle conduit à la mise en place d'évènements de signalisation intracellulaire concourant à l'activation d'une réponse (Jones et Dangl, 2006). Parmi les premiers évènements de signalisation suite à la perception d'un pathogène figurent des flux d'ions à travers la membrane plasmique, notamment des influx de  $\text{Ca}^{2+}$  et des efflux de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{Cl}^-$  puis de  $\text{K}^+$ . Ces mouvements d'ions déclenchent une dépolarisation membranaire, dont l'amplitude et la durée dépendent de l'éliciteur (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Ces flux d'ions agissent en amont d'autres évènements de signalisation incluant notamment l'activation des **MAPK** (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) et des CDPK (*Ca<sup>2+</sup>-Dependant Protein Kinases*) enzymes responsables de processus de phosphorylation/déphosphorylation (Rodriguez *et al.*, 2010). De plus, ils opèrent en amont de la production précoce de formes actives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (*Reactive Nitrogen Species* ou RNS). Les ROS, dont les principales sont le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ), limitent le développement du pathogène de façon directe grâce à leur toxicité mais également en participant au renforcement des parois cellulaires de la plante.

Parmi les molécules de signalisation présentes dans les interactions de plantes-pathogènes, les phytohormones telles que l'éthylène (ET), l'acide jasmonique (JA) et l'acide salicylique (SA) jouent un rôle important dans la régulation des voies de transduction de signal. Ce dernier est le résultat d'un réseau très complexe de régulation et de connexion entre les différentes voies.

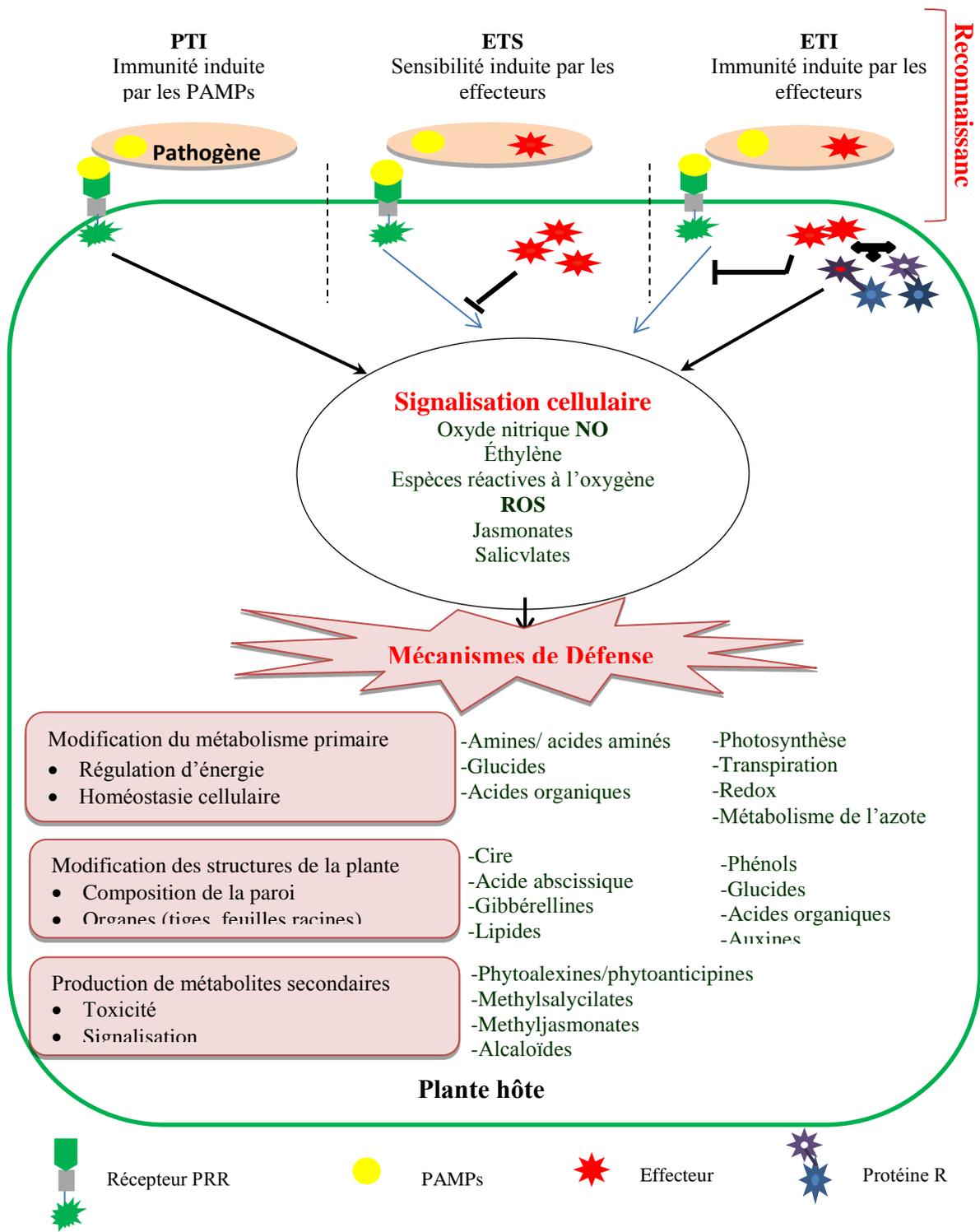
L'acide salicylique occupe le rôle majeur dans l'activation de défense contre les pathogènes biotrophes, tandis que le jasmonate et éthylène sont préférentiellement associés à la défense contre les pathogènes nécrotrophes (Van Loon *et al.*, 2006).

### ***Les réponses de défense***

Après reconnaissance du pathogène, un renforcement de la paroi au site d'infection est observé. Ce renforcement consiste en une réorganisation structurale et chimique de la paroi *via* le dépôt de molécules nouvellement synthétisées. Les ROS permettent ce renforcement en catalysant la lignification des parois végétales (Huckelhoven, 2007). En plus de ces dépôts, on observe une accumulation de composés phénoliques toxiques (Lherminier *et al.*, 2003).

En plus du renforcement pariétal, les réponses de défense se caractérisent par la production de composés toxiques directement adressés contre le microorganisme pathogène. Ces composés, de natures variées (phénols, flavonoïdes, terpènes, tannins, etc.), synthétisés suite à une infection ou une élicitation, sont regroupés sous le terme de phytoalexines (Hammerschmidt, 1999).

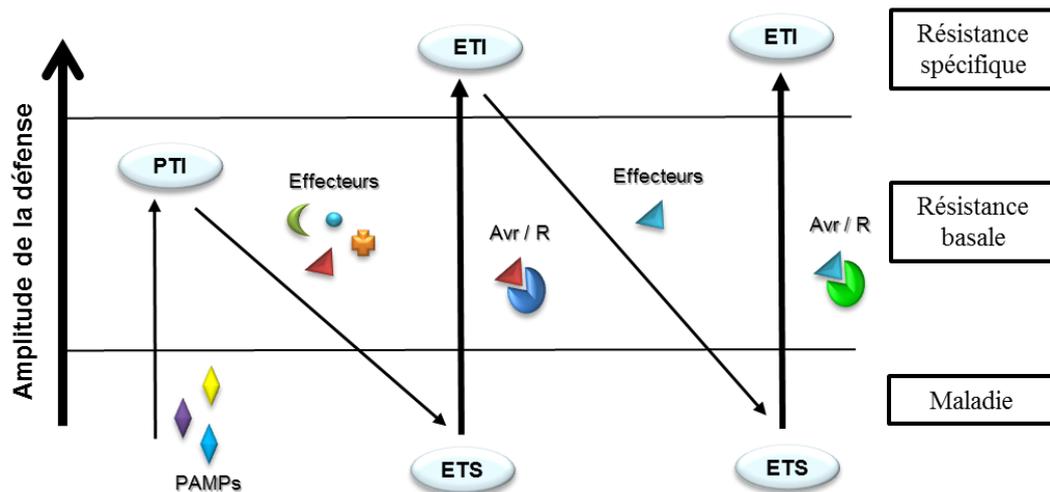
Par ailleurs, en réponse à de nombreux pathogènes, chez un grand nombre d'espèces végétales, des protéines majoritairement cytoplasmiques appelées protéines PR sont produites (Van Loon *et al.*, 2006). Ces protéines classées en 17 familles, joueraient le rôle de récepteurs intracellulaires pour les effecteurs injectés par le pathogène et possèdent, selon leurs propriétés biochimiques, des rôles biologiques. La plupart possèdent des propriétés antimicrobiennes et agissent au travers d'activités hydrolytiques, se traduisant par la dégradation de la paroi du pathogène ou par une toxicité vis-à-vis du pathogène. C'est le cas des  $\beta$  1-3 glucanases (PR-2), des chitinases (PR-3, -4, -8 et -11), des endoprotéases (PR-7), ou encore des défensines (PR-12), des thionines (PR-13) et de certaines protéines de transfert de lipides (PR-14). La perception des effecteurs d'virulence ou *Avr* du pathogène par les protéines *PR* de plante implique différents mécanismes (Jones et Dangl, 2006).



**Figure 12.** Modifications physiologiques et moléculaires qui peuvent apparaître durant l'interaction entre une plante et un pathogène (Schéma adapté de Heuberger *et al.*, 2014)

A leur tour les plantes peuvent détecter des agents spécifiques capables de supprimer la résistance innée et produisent des protéines codées par des gènes de résistance R soit un deuxième niveau de résistance.

Ce **second niveau de défense** ou l'**ETI** (*Effector-Triggered Immunity*) peut alors être mis en place par la plante. Cette résistance spécifique initie une cascade d'événements cellulaires et s'accompagne par une mort cellulaire au site d'infection : c'est la réaction d'hypersensibilité **HR**, conduisant à la résistance. L'ETI pourra de nouveau être détournée par le pathogène *via* la production de nouveaux effecteurs que la plante reconnaitra ensuite *via* la sélection de nouvelles protéines PR. Ce **mécanisme s'inscrit dans un processus de coévolution des plantes et des pathogènes, les pathogènes contournant les barrières immunitaires des plantes qui mettent à leur tour en place des réponses plus spécifiques qui peut être illustré par le modèle en zig zag** proposé par Jones et Dangl, 2006 (Fig.13).



**Figure 13.** Modèle en zig-zag illustrant le système immunitaire des plantes et la coévolution des mécanismes de défense et d'attaque des plantes et des agents pathogènes (Jones et Dangl, 2006)

#### 1.4.3. Voies métaboliques primaires des plantes et leur rôle dans la défense

En réponse à une attaque pathogène, de petites molécules sont synthétisées et agissent comme molécules ou comme signaux pour induire des modifications dans le métabolisme primaire, changer la structure de la plante et produire des métabolites secondaires (Heuberger *et al.*, 2014).



l'arsenal de défense des plantes sont issus du métabolisme primaire (Fig.14) (Matyssek *et al.*, 2014). Plusieurs sont liés à la production énergétique telle que la glycolyse, la voie des pentoses phosphate, le cycle de Krebs, le transport mitochondrial d'électrons, la biosynthèse d'adénosine triphosphate (ATP) et la biosynthèse de certains acides aminés. D'autres sont associés aux processus assimilateurs tels que le métabolisme d'amidon, le métabolisme des lipides et la biosynthèse des acides aminés (Rojas *et al.*, 2014).

#### **1.4.3.1. Métabolisme des sucres**

Le métabolisme des sucres est lié aux réponses de la défense dans l'induction des gènes de protéines PR, la régulation de l'expression des gènes liés à la défense, l'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et la mort cellulaire (Kim *et al.*, 2006).

#### **1.4.3.2. Métabolisme des acides Aminés**

Certains acides aminés tels la valine, la leucine et la tyrosine s'accumulent après traitement avec les agents pathogènes et leur métabolisme déclenche des réponses de résistance contre les agents pathogènes et abouti à la synthèse des alcaloïdes, métabolites secondaires de la défense des plantes (Colodete *et al.*, 2015). La méthionine est le précurseur de molécules ayant un rôle dans cette relation. La S-adenosylmethionine intervient dans la synthèse de flavonoïdes (Pasquier, 2012).

#### **1.4.3.3. Métabolisme des lipides**

Les lipides constituent un large groupe de molécules naturelles avec des fonctions biologiques diverses. Ils fournissent les composants structurels pour la paroi cellulaire (sous forme de cires et de cutine) et la membrane cellulaire, et fournissent également l'énergie pour le métabolisme (Welti *et al.*, 2007). Ils sont également des médiateurs dans beaucoup de processus, y compris la transduction de signal, les réarrangements cytosquelettiques et le transport transmembranaire (Wang, 2004). Ces processus sont cruciaux pour la survie, la croissance et la différenciation de cellules et pour des réponses des plantes aux stress (Welti *et al.*, 2007).

Le métabolisme des acides gras représente un point de convergence pour des cascades de signalisation de la défense impliquant l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'oxyde nitreux. Les Sphingolipides participent au déclenchement du processus de la mort cellulaire par la génération des ROS en liaison avec les toxines fongiques.

La complexité des réponses de la défense des plantes exige un approvisionnement en énergie abondant, principalement dérivé des processus métaboliques primaires (Bolton, 2009). Ces voies métaboliques primaires sont employées non seulement comme source d'énergie pour les réponses

de la défense, mais également comme source des molécules de signalisation impliquées (directement ou indirectement) dans la défense. Beaucoup de gènes impliqués dans des processus de catabolisme des sucres tels que la glycolyse et le cycle d'acide trichloracétique (TCA) induisent des réponses de la défense telles que l'activation des gènes des protéines PR. La connexion intrinsèque entre le métabolisme des sucres et la biosynthèse de quelques acides aminés renforce la défense par la génération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et l'activation des voies de l'acide salicylique et de la proline (molécules souvent associées aux stress) (Rojas *et al.*, 2014).

Enfin, les composants du métabolisme primaire sont directement ou indirectement impliqués dans l'induction d'une réponse de défense pour empêcher ou arrêter la prolifération d'un agent pathogène potentiel (Bolton, 2009).

#### **1.4.4. Mécanismes de défense du pois chiche *Cicer arietinum* L.**

Dans leur lutte permanente pour la survie, les plantes évoluées ont développé des stratégies de défense très diversifiées qui leur permettent de résister aux agressions de la plupart des microorganismes (Lepoivre, 2003). Ces mécanismes de défense sont de deux types :

**Des mécanismes passifs, constitutifs**, antérieurs à l'infection. Ils peuvent être physiques et concernent les caractéristiques structurales de la plante comme la cuticule et le périoderme subérisé ou chimiques tels que les métabolites secondaires accumulés normalement durant le développement de la plante et toxiques aux microorganismes. Bien qu'indépendants de l'infection ils peuvent agir comme une barrière contre la pénétration du pathogène (Agrios, 2005, Jayakumar *et al.*, 2005).

##### **Les mécanismes actifs induits**

Suite à l'infection une multitude de signaux moléculaires sont échangés (Dickinson, 2003) et en résulte des modifications histologiques comme la modification de la paroi des cellules hôtes par des appositions de callose, de matières pectiques, de suber, de lignine (Lepoivre, 2003) et d'autres biochimiques par la formation et l'accumulation de métabolites comme les phytoalexines qui agissent comme des antibiotiques contre les microorganismes (Agrios, 2005).

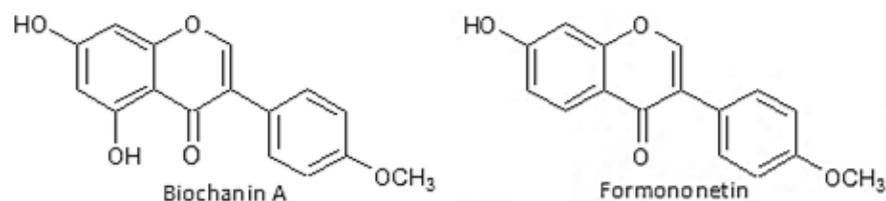
##### **1.4.4.1. Les mécanismes constitutifs passifs**

Chez le pois chiche les trichomes et leurs exsudats acides qui s'accumulent sur la surface des folioles à des concentrations élevées ont un effet inhibiteur sur la germination des spores d'*Ascochyta rabiei* d'où l'hypothèse de leur possible rôle dans la défense (Hafiz, 1952 *in* Ameziane El-Hassani, 1981). Cependant, Armstrong-Cho et Gossen (2005) réfutèrent cette

proposition puisque toutes les recherches entreprises dans cette voie n'ont pu établir de corrélation entre la résistance à *Ascochyta rabiei* et les trichomes de *Cicer arietinum* L.

La structure des cellules et leur organisation dans les tissus jouent un rôle dans la résistance du pois chiche à *Ascochyta rabiei* (Jayakumar *et al.*, 2005). Les études histologiques des tissus des cultivars résistants ont révélé que les parois externes des cellules épidermiques de la tige étaient plus épaisses par rapport à celles des cultivars sensibles, de plus il a été remarqué que l'épiderme compte plus de couches de cellules (Venora et Porta-Puglia, 1993), plus de cellules xylémiennes et que le parenchyme inter fasciculaire est plus important (Jayakumar *et al.*, 2005). Ces caractéristiques structurales jouent le rôle de barrières physiques et sont considérées comme des mécanismes constitutifs de défense qui retardent la propagation du pathogène (Venora et Porta-Puglia, 1993).

Par ailleurs, le pois chiche accumule durant sa croissance, deux métabolites secondaires (isoflavonoïdes): la Biochanin A et le Formononetin (Fig. 15) (Weigand *et al.*, 1986; Bashir, 1998; Jayakumar *et al.*, 2005) ou appelés encore par Lepoivre (2003) « anticypines ». Ils sont présents à de fortes concentrations dans le cortex et les cellules subépidermiques où ils sont stockés dans les vacuoles sous forme d'aglycones (Jayakumar *et al.*, 2005). Ils semblent jouer un rôle de précurseurs des phénols synthétisés *de novo* après l'infection (Weigand *et al.*, 1986; Jayakumar *et al.*, 2005).

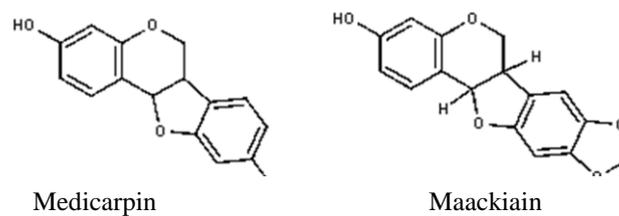


**Figure 15.** Structure biochimique des flavonoïdes constitutifs du pois chiche (Kessman *et al.*, 1988)

#### 1.4.4.2. Mécanismes actifs, induits

Le pois chiche est capable de se défendre contre l'agent de l'antracnose par le biais d'autres mécanismes mis en œuvre après l'infection. Les nombreuses études entreprises dans le but d'expliquer la résistance de certains cultivars de *Cicer arietinum* L. contre *Ascochyta rabiei* ont mis en évidence leur capacité à accumuler de substances phénoliques (Weigand *et al.*, 1986). Ces substances à action antimicrobienne sont des composés de faible poids moléculaire, appelés phytoalexines, synthétisés *de novo*, en réponse à un stress (Lepoivre, 2003; Macheix *et al.*, 2005).

Chez le pois chiche comme chez plusieurs légumineuses ce sont des isoflavonoïdes (Lepoivre, 2003). Les pterocarpan sont le second plus large groupe d'isoflavonoïdes naturels, trouvés principalement chez les fabacées. Ils sont produits dans les tissus sains tout autour du site d'infection souvent excrétés dans l'espace extracellulaire ou dans la zone des tissus nécrosés (Jimenez Gonzalez *et al.*, 2008). Les premiers travaux ont mis en évidence une phytoalexine associée à l'antracnose du pois chiche appelée cicérine (Malhotra, 1983) qui semble être un mélange des deux Pterocarpan, (Medicarpin et Maackiain) (Fig.16) mises évidence chez les cultivars de pois chiche après leur induction avec des spores d'*Ascochyta rabiei* (Weigand *et al.*, 1986). Ce résultat fut confirmé par Kessman et Barz (1987).



**Figure 16.** Structure biochimique des flavonoïdes induits du pois chiche (Kessman *et al.*, 1988)

Par ailleurs, de nombreuses études histochimiques des cultivars résistants ont mis en évidence une formation de peroxyde d'hydrogène dans l'apoplaste des cellules de plantes inoculées avec *Ascochyta rabiei* (Jayakumar *et al.*, 2005). Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) participe à la défense des plantes en agissant directement sur le pathogène comme composé toxique ou en catalysant un bon nombre de réactions comme la biosynthèse des lignines, de subérine et des glycoprotéines qui renforcent la paroi des cellules de l'hôte et stoppent la pénétration du pathogène (Jayakumar *et al.*, 2005).

Après l'infection en plus de l'accumulation de phytoalexines, certaines protéines dites protéines reliées à la pathogénèse (PR) sont synthétisées (Bashir, 1989). Elles sont accumulées principalement dans l'espace apoplastique des folioles (Jayakumar *et al.*, 2005) et incluent les  $\beta$ , 1-3 glucanases et les chitinases. Ce sont des enzymes hydrolytiques qui jouent un rôle crucial dans la défense vu leur capacité à inhiber la croissance du champignon en dégradant les constituants de la paroi des cellules fongiques (Vogelsang *et al.*, 1994; Shahid, 2004).

## 1.5. Les méthodes de lutte

L'antracnose chez *Cicer arietinum* L. est le résultat d'une relation triangulaire qui fait intervenir l'hôte, le parasite et l'environnement, par conséquent, l'établissement d'une stratégie de lutte efficace doit impérativement tenir compte de ces trois éléments (Chandirasekaran, 2007).

Les dégâts causés par cette maladie peuvent être réduits par des méthodes essentiellement prophylactiques (Zikara-Zine, 2003) qui sont un ensemble de plusieurs moyens dans le but d'éliminer les foyers et sources d'infection (Davidson et Kimber, 2007).

### 1.5.1 Méthodes culturales

La lutte contre l'antracnose du pois chiche utilise plusieurs pratiques culturales, dans le but d'éradiquer ou réduire les sources d'inoculum primaire et éviter les contaminations secondaires (Davidson et Kimber, 2007). La plus importante est l'utilisation de graines saines certifiées par des laboratoires accrédités. Ceci permet d'éviter l'installation et la transmission de la maladie (Kaiser, 1997). L'élimination ou l'enterrement des résidus des plantes infectées où peut se reproduire le pathogène sous ses deux formes (Davidson et Kimber, 2007) est également une pratique importante qui aide à contrôler l'antracnose du pois chiche. En effet, selon Navas-Cortes *et al.* (1995), le pathogène peut survivre plus de deux ans sur les débris laissés sur le sol après la récolte et leur enterrement réduit la viabilité du champignon à six mois.

Le choix de la date de semis permet de réduire l'extension de l'épidémie. En effet, vu la nature polycyclique de l'antracnose, le décalage de la date de semis afin d'éviter les périodes froides et humides favorables à la maladie, aide à limiter le nombre de cycles de pycnidiospores et par conséquent, les contaminations (Davidson et Kimber, 2007). Dans les pays du bassin méditerranéen, le pois chiche est semé pendant l'hiver, saison propice à l'apparition de la maladie (Crino, 1990). Ainsi selon Ben Mohamed *et al.* (2010), opter pour un semis entre mars et avril, aide à lutter contre *Ascochyta rabiei*. Par ailleurs, l'espacement d'au moins 500m les parcelles cultivées peut aider à éviter la propagation de l'épidémie par le vent ou les éclaboussures de pluie (Gan *et al.*, 2006).

La rotation avec d'autres cultures de plantes non hôtes tous les trois à quatre ans est aussi une alternative pour lutter contre *Ascochyta rabiei* (Ali *et al.*, 2008). Néanmoins il faut veiller à nettoyer les parcelles des résidus après chaque culture car selon Trapero-Casas et Kaiser (2009), des plantes comme le blé et le maïs pourraient abriter le pathogène sous sa forme sexuée et participeraient ainsi à propager la maladie.

### 1.5.2. La lutte chimique

Le traitement par les fongicides concerne aussi bien les graines qui sont utilisées comme semis, que les plantes dans les champs. Les graines peuvent abriter le pathogène jusqu'à deux ans même sous une température de 45 °C et plus de deux ans si elles sont stockées entre 2 et 5 °C (Gan *et al.*, 2006). Pour les assainir, elles sont traitées par des méthodes chimiques et physiques en vigueur depuis les années trente du siècle dernier. Différents moyens sont utilisés comme l'immersion dans de l'eau chaude à 53 °C pendant 15 min (Nene et Reddy, 1987) ou dans une solution de sulfate de cuivre (Davidson et Kimber, 2007) ou de vert de malachite à 0,005% durant 2 à 4 heures (Saxena et Singh, 1984).

Dès les années quatre-vingt, plusieurs fongicides ont été mis au point pour prévenir la germination des spores, réduire la croissance mycélienne sur la surface des graines et éradiquer complètement le champignon des téguments (Davidson et Kimber, 2007). L'utilisation du bénomyl un fongicide de la famille des méthylbenzimidazole carbamate qui inhibe la mitose (Carlile *et al.*, 2001) à une concentration de 10 µg/ml, est très efficace pour assainir les graines de pois chiche (Gan *et al.*, 2006). Cependant l'efficacité des graines enrobées de fongicides dans le contrôle de l'antracnose dépend entre autre de quelques facteurs comme les conditions climatiques et les caractéristiques du sol.

L'application de fongicides foliaires efficaces joue un rôle prépondérant dans la réduction des dégâts causés par cette maladie (Chongo *et al.*, 2004). Le chlorothalonil appliqué sur les folioles au champ, stoppe la germination des spores (Singh et Reddy, 1989), cependant, d'après Shteinberg *et al.* (2000), le résultat peut différer d'une région à une autre, quelques produits reconnus efficaces contre l'antracnose du pois chiche comme le maneb, le zineb et le captan n'ont donné aucun résultat. L'efficacité de ces fongicides dépend d'autres paramètres notamment le degré de résistance de la plante hôte, les conditions climatiques et l'architecture de la plante (Armstrong-Cho *et al.*, 2008).

### 1.5.3. La lutte biologique

La préservation des ressources naturelles et la santé humaine est une des préoccupations majeures des chercheurs dans le domaine de l'agriculture. De plus en plus d'efforts sont fournis pour trouver des produits naturels biologiques pour lutter contre les maladies des végétaux (Baker et Cook, 1974; Lewis et Papavizas, 1991; Alabouvette *et al.*, 2004). Pour l'antracnose du pois chiche la lutte biologique pourrait être possible par deux moyens :

i L'utilisation des microorganismes antagonistes à *Ascochyta rabiei* comme les champignons *Aureobasidium pullulans* et *Clonostachys rosea* qui d'après Dugan *et al.* (2005) inhiberaient la croissance des deux formes anamorphe et téléomorphe de l'agent de l'antracnose ou celle de *Chaetomium globosum*, *Trichoderma viride*, *Aerobasidium implicatum* qui selon Rajakumar *et al.* (2005) auraient un effet antifongique testé *in vivo* et *in vitro* sur *Ascochyta rabiei*. Par ailleurs, Navas-Cortes *et al.* (1995) rapportent que l'enterrement des débris infectés dans le sol stérile permet la formation de pseudothèces et de spores plus vite par rapport au sol non stérilisé, ce qui prouve que le champignon est affecté par la présence d'autres microorganismes saprophytes.

ii. L'application d'extraits végétaux comme biofongicides. C'est le cas de l'extrait aqueux d'oignon *Allium cepa* qui aurait montré une activité antifongique contre *Ascochyta rabiei* (Chandirasekaran, 2007), de l'extrait des racines et pousses de *Datura metel* composé essentiellement de n-hexane qui agit sur la croissance *in vitro*, de l'agent de l'antracnose du pois chiche (Shaffique et Shaffique, 2008), de même que l'extrait méthanolique des feuilles de *Melia azedarach* qui a le même effet qu'un fongicide commercial sur *Ascochyta rabiei* (Jabeen *et al.*, 2010).

#### 1.5.4. La lutte génétique

L'utilisation de cultivars résistants est sans doute le moyen le plus pratique pour contrôler l'antracnose chez *Cicer arietinum* L., c'est pourquoi l'objectif majeur de tous les programmes d'amélioration du pois chiche à travers le monde est la sélection d'espèces résistantes (Pieters et Tahiri, 1986; Reddy et Singh, 1990; Iqbal *et al.*, 2004; Rhaiem *et al.*, 2007; Kavousi, 2009; Bhardwaj *et al.*, 2010).

Bien que connue depuis presque un siècle l'antracnose continue à être un problème pour les agriculteurs et peu de progrès ont été faits dans le domaine de la sélection de cultivars résistants (Singh et Singh, 1992; Wise *et al.*, 2009; Pande *et al.*, 2010 a; Kimurto *et al.*, 2013). Plusieurs travaux ont été entrepris surtout ces soixante dernières années dans le but de développer des génotypes de pois chiche résistants à l'antracnose mais sans aucun résultat notable vu les sources réduites de résistance (Singh *et al.*, 1984). D'un autre côté la variabilité génétique d'*Ascochyta rabiei* entrave aussi le développement de cultivars résistants utilisable à travers le monde (Singh, 1990) d'où l'intérêt d'utiliser les outils de la biotechnologie pour lutter contre l'antracnose du pois chiche (Dita *et al.*, 2006).

Pour conclure, il est important de souligner que toute stratégie de lutte contre l'antracnose du pois chiche doit impérativement intégrer, à la fois, plusieurs de ces méthodes citées pour arriver à

éradiquer ou limiter la propagation du pathogène. D'après Gan *et al.* (2006), dans une région connue pour l'apparition fréquente de la maladie, il serait plus judicieux de prendre toutes les mesures prophylactiques qui sont offertes et opter pour l'utilisation concomitante des méthodes génétiques, culturales ou chimiques pour éviter la déclaration de la maladie ou en limiter l'étendue.

### **1.6. Apport des biotechnologies à l'amélioration des plantes**

Considérée comme la technologie du vingt et unième siècle, la biotechnologie est un champ multidisciplinaire où coexistent la science avec ses différentes branches et la technologie. Elle utilise les organismes vivants pour modifier et améliorer des espèces végétales et animales ou pour développer des microorganismes pour exploiter leur métabolisme.

La biotechnologie moderne trouve un champ d'application presque dans tous les domaines; l'aquaculture, la santé, l'environnement et l'agriculture. La biotechnologie végétale ou agricole offre des idées modernes et des techniques complémentaires aux méthodes conventionnelles (Ricroch *et al.*, 2014). Elle aspire à solutionner les problèmes qui surviennent dans toutes les étapes de la production et la transformation des produits agricoles (Ameziane El Hasani et Persoons, 1984). En effet, l'établissement d'une agriculture moderne qui fait face à l'insécurité alimentaire est inconditionnellement lié à l'intégration des outils de la biotechnologie aux pratiques culturales conventionnelles (Haggag, 2008) qui reposent sur les techniques de sélection massale ou de croisement interspécifiques et inter génériques (Dubois, 1989). Grâce au développement fulgurant qu'a connu la biologie cellulaire, il est aujourd'hui possible d'utiliser les techniques de la biotechnologie dans la recherche fondamentale, l'étude de la réaction des plantes aux stress (Kosturkova *et al.*, 2012) et pour propager à grande échelle des individus à caractères intéressants, à sélectionner des végétaux à haut rendement et/ou résistants aux stress biotiques et abiotiques (Ameziane El Hasani et Persoons 1984; Zrýd, 1988). Ces outils comme la mutagenèse *in vitro* et la culture de cellules et de tissus contribuent à limiter les dégâts causés par les stress biotiques et abiotiques surtout quand les sources de résistance naturelles sont inexistantes ou faibles (Dita *et al.*, 2006).

La combinaison entre les techniques phytopathologiques et biotechnologiques fournit une approche alternative aux méthodes classiques de sélection de plantes résistantes (Svabova et Lebeda, 2005).

### 1.7. La culture *in vitro*

La culture cellulaire et tissulaire qui se basent sur la totipotence cellulaire ou « la capacité qu'a une cellule à se diviser et produire une plante entière » trouvent leur origine au début du siècle dernier. C'est le botaniste allemand Haberlandt en 1902 qui réalisa les premières cultures de tissus végétaux. Depuis, la culture *in vitro* a connu plusieurs étapes décisives qui ont permis de mettre au point des milieux de culture de plus en plus améliorés grâce aux travaux de plusieurs chercheurs comme Nobécourt, White, Hilderbrandt, Murashige et Skoog, en particulier après la découverte des hormones de croissance végétales qui révolutionnèrent la culture *in vitro* (Vasil, 2008).

Cette technique offre de nombreux avantages comme la simplicité de l'expérience, la capacité de contrôler les facteurs environnementaux et la possibilité de tester un grand nombre d'échantillons dans un espace réduit avec plusieurs répétitions (Jang et Tainter, 1990a) dans un temps relativement court avec comme matériel végétal des cellules, des tissus ou des organes à la place d'une plante entière (Sacristan, 1982; Yang et Bernier, 1996). Elle a ouvert de nouvelles voies en phytopathologie et constitue un moyen simple pour étudier les pathogènes obligatoires comme les champignons responsables des mildious difficilement cultivables en milieux artificiels hors de leurs hôtes habituels.

L'association du parasite avec l'hôte est le point de départ pour la réalisation de diverses expérimentations comme l'étude des cycles de reproduction, l'analyse biochimique des phénomènes de résistance et de sensibilité. C'est Morel en 1948 qui étudia en premier l'infection de culture de vigne avec les conidies de *Plasmopara viticola* et depuis les travaux se sont élargis sur plusieurs pathosystèmes *Plasmodiopara brassicae/Brassica*, *Ustilago maydis/maïs*, *Plasmopara halstedii/tournesol* (Dai *et al.*, 1995; Goyal *et al.*, 1995).

### 1.8. Le criblage *in vitro*

Les cellules végétales, tissus et organes peuvent être cultivés *in vitro* et ces cultures peuvent être développées en plantes entières (Vidhyasekaran, 2004). Les techniques de criblage ou sélection par le biais de la culture *in vitro* se basent sur l'apparition d'une variation génétique spontanée ou induite. La variation spontanée dite somaclonale est une variabilité qui apparaît au niveau de quelques caractères phénotypiques ou génotypiques, sans aucun traitement mutagène (Zryd, 1988). Elle peut être exploitée dans la sélection de plantes résistantes aux agents pathogènes (Zryd, 1988; Jang et Tainter, 1990a; Yamakawa et Li-Hong Chen 1992; Vidhyasekaran, 2004).

La variation induite est obtenue soit par la coculture du pathogène et des tissus de l'hôte ou par la culture de l'hôte sur un milieu contenant un agent sélectif qui peut être une toxine (Pijut *et al.*, 1990, Slavov, 2005; Lepoivre, 2003) ou un filtrat de culture (Zrýd, 1988). Le criblage *in vitro* permet une sélection préliminaire devant être suivie d'une confirmation du caractère de résistance par inoculation en serre ou au champ. Pour certains couples hôte-champignon, les plantes régénérées à partir de tissus sélectionnés par coculture sont résistantes à l'infection par l'agent pathogène comme dans le cas du melon (*Cucumis melo*) au *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Bouabdallah, 1986), *Brassic napus/Phoma lignam* (Sacristán, 1982), medicago sativa/ *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* (Hartman *et al.*, 1984), les plantes de millet avec *Sclerospora graminicola* (Upadhyaya *et al.*, 1992), le blé et *Helminthosporium sativum* (Svabova et Lebeda, 2005). Cependant chez d'autres cas, les résultats ne sont pas concluants, ceci est probablement dû à l'impossibilité de l'expression des mécanismes de résistance dans le milieu de culture (Lepoivre, 2003).

### **1.9. Application de la culture *in vitro* pour l'amélioration du pois chiche**

Les efforts fournis pour la multiplication et l'amélioration de *Cicer arietinum* sont affectés par sa variabilité génétique limitée et le manque de techniques biotechnologiques adaptées aux espèces (McPhee *et al.*, 2007). L'utilisation de la culture de tissus *in vitro* vise à dépasser ces contraintes. Actuellement l'utilisation pratique de la culture de tissus *in vitro* pour l'amélioration du pois chiche se limite à l'hybridation interspécifique assistée *in vitro*, pour le développement de lignées, la sélection *in vitro* de cals de génotypes tolérant au NaCl, à l'herbicide atrazine (McPhee *et al.*, 2007) et à *Ascochyta rabiei* (Kumar *et al.*, 2010). La culture de cals est également utilisée pour l'étude et la compréhension des bases biochimiques des mécanismes de défense contre l'anthracnose (McPhee *et al.*, 2007) et la fusariose (Singh *et al.*, 2003).

# Matériel et méthodes

---

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Le matériel végétal

Les graines de sept génotypes de pois chiche qui proviennent de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) de Sidi bel Abbas sont utilisées pour fournir le matériel végétal. Il s'agit de Bousahla, ICC 3996 C, Zouaoui, INRA 199, ILC 483, ILC 200 et Flip 82150 C (Tab.2)

**Tableau 2.** Origine des génotypes de pois chiche et leur réaction vis à vis d'*Ascochyta rabiei*

Génotype	Origine	Type	Réaction
Flip 82 150 C	ICARDA	Kabuli	Tolérant
INRA 199	INRA	Desi	Résistant
ICC 3996 C	ICRISAT	Desi	Résistant
ILC 200	ICARDA	Kabuli	Résistant
ILC 483	ICARDA	Kabuli	Sensible
Bousahla	Indéterminé	Kabuli	Indéterminé
Zouaoui	Indéterminé	Kabuli	Indéterminé

*ICARDA: International Center for the Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria. ICRISAT: International Crops Research Institute Semiarid Tropic, Patanchero, India. INRA: Institut National de la Recherche Agronomique, Versailles, France.*

Elles sont mises en culture dans des pots de 12 x 12 cm, contenant un mélange de terre et de terreau (3:1, v/v) préalablement autoclavé, à raison de 3 graines par pot. La culture est menée sous serre et les plantes sont arrosées quotidiennement avec de l'eau de robinet.

### 2.2. Le matériel fongique

La souche d'*Ascochyta rabiei* utilisée, provient d'une culture monospore du champignon obtenue à partir de gousses, des tiges ou des feuilles de plantes atteintes d'antracnose prélevées dans la région d'Ain Témouchent. Le champignon est conservé à 4 °C dans des tubes à essai contenant de l'huile de vaseline stérile sous forme d'explantats de 0,5 cm découpés dans des colonies pures d'*Ascochyta rabiei* obtenues sur le milieu de culture PC (Pois Chiche) (Annexe 1).

### 2.3. Culture du champignon

Sous des conditions aseptiques, les explantats du mycélium d'*Ascochyta rabiei*, conservés dans l'huile de vaseline, sont soigneusement séchés sur du papier filtre stérile pour absorber toute l'huile. Ils sont mis en culture dans des boîtes de Pétri contenant du milieu pois chiche (PC) à raison d'un explantat par boîte de telle façon que le mycélium soit en contact avec le milieu. Les boîtes scellées avec du parafilm, sont incubées à température ambiante, sous une photopériode de 12 heures.

### 2.4. Préparation de la suspension de spore du pathogène

La suspension de spores est préparée à partir d'une culture fongique de 14 jours. La méthode suivie et celle décrite par Gustine et Sherwood (1978). Les spores sont délicatement grattées de la surface de la culture fongique avec une spatule stérile puis suspendues dans 10 ml d'eau distillée stérile. La suspension est filtrée à travers du papier filtre stérile, puis sa concentration ajustée à  $10^6$  spores /ml après comptage sur la cellule de Malassez.

### 2.5. Test de pathogénicité du champignon

Le test est appliqué sur des folioles détachées obtenues de la plante mère âgée de trois semaines par culture sur du terreau stérile. Les folioles sont désinfectées avec une solution d'eau de Javel à 2% pendant 1 minute puis rincées avec de l'eau distillée stérile. Pour chaque génotype, 5 folioles sont placées dans une atmosphère humide (boîtes de Pétri de 11 cm de diamètre avec du papier filtre préalablement stérilisé puis humecté à l'eau distillée stérile). L'opération est répétée 3 fois.

Dans des conditions stériles, chaque foliole est inoculée avec une suspension de spores d'*Ascochyta rabiei* concentrée à  $10^6$  spores/ml, fraîchement préparée, au centre de la surface où est occasionnée au préalable une blessure avec l'aiguille d'une seringue stérile. Des folioles inoculées avec de l'eau distillée stériles sont utilisées comme témoin. Les boîtes sont scellées et incubées à  $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$  sous un régime photopériodique de 12 heures lumière/12 heures obscurité (Akhtar *et al.*, 2012). Les observations sont effectuées après 12 jours post-inoculation. L'incidence de la maladie (DI) est évaluée selon l'équation

$$DI = \frac{\text{nombre de folioles avec des lésions nécrotiques}}{\text{nombre total de folioles}} \times 100$$

Un génotype est considéré sensible (S), tolérant (T) ou résistant (R) si la valeur de l'incidence de la maladie est  $>30 \%$ ,  $20 \% - 29 \%$  ou  $5 \% - 19 \%$ , respectivement (Harijati *et al.*, 2012). Ce

test peut être considéré comme un moyen d'étude préliminaire rapide du type de réaction des différents génotypes au pathogène.

## 2.6. Obtention et maintien des cals hôtes

L'initiation de la callogenèse est établie à partir de folioles, de segments de tiges et de cotylédons. Sous des conditions aseptiques, les explants foliaires et des entrenœuds de 5 mm de longueur prélevés de plantes âgées de 03 semaines, sont désinfectés par immersion dans de l'éthanol à 70° pendant 30 secondes, puis dans une solution d'hypochlorite de sodium à 5 % pendant une minute et enfin rincés trois fois avec de l'eau distillée stérile. Pour les cotylédons, les graines sont lavées à l'eau courante puis désinfectées sous hotte à flux laminaire dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2 % pendant 5 minutes et rincées 3 fois avec de l'eau distillée stérile. Elles sont conservées dans l'eau distillée stérile pendant 12 h à 4 °C pour imbibition tout en évitant leur germination. Sous conditions stériles, le tégument est ôté et les cotylédons sont séparés des embryons puis récupérés.

L'induction de la callogenèse est menée sur le milieu Murashige et Skoog (1962) (MS, annexe 1) de base, additionné de 17 différentes combinaisons hormonales (Tab.3) pour chaque génotype et explant. Les milieux contiennent 30 g/l de saccharose et sont solidifiés avec 10 g/l d'agar. Le pH est ajusté à 5,8 avant autoclavage.

Pour tous les milieux et dans le cas des deux explants (tiges et folioles), pour les 07 génotypes testés, 10 fragments sont placés dans des boîtes de Pétri contenant 10 ml de milieu de culture. Elles sont ensuite incubées à 25 °C ± 2 sous une photopériode de 16 h lumière/8 h obscurité. L'expérience est répétée 5 fois.

La réponse des explants est suivie régulièrement et l'effet des différents traitements est évalué après quatre semaines. Le pourcentage est calculé sur la base du nombre de cals formés par rapport au nombre total des explants testés.

Sur l'ensemble des milieux testés, seuls les milieux MS1, MS5, MS7, MS11 et MS14 sont retenus pour l'initiation de la callogenèse étant donné qu'aucune réponse n'est obtenue pour le reste des combinaisons. Par ailleurs, le repiquage mensuel des cals semble favoriser leur brunissement. Pour y remédier, dans les étapes ultérieures, les combinaisons hormonales sont maintenues et le milieu MS est modifié (MS<sub>m</sub>) par l'addition de 15 g de saccharose / litre de milieu au lieu de 30 g utilisés initialement.

**Tableau 3.** Combinaisons hormonales ajoutées au milieu MS pour l'initiation de la callogenèse chez *Cicer arietinum* (2,4-D : 2,4-D Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, ANA : Acide naphthalèneacétique; BAP : 6-benzylaminopurine

Milieux	Hormones (mg/l)		
	2,4-D	ANA	BAP
MS1	2	//	//
MS2	4	//	//
MS3	8	//	//
MS4	16	//	//
MS5	//	0,5	//
MS6	//	1	//
MS7	0,5	//	1
MS8	1	//	1
MS9	1	//	2
MS10	2	//	2
MS11	2	0,5	//
MS12	4	0,5	//
MS13	4	//	4,5
MS14	//	0,5	2,25
MS15	//	0,5	4,5
MS16	//	0,5	1
MS17	//	0,5	2

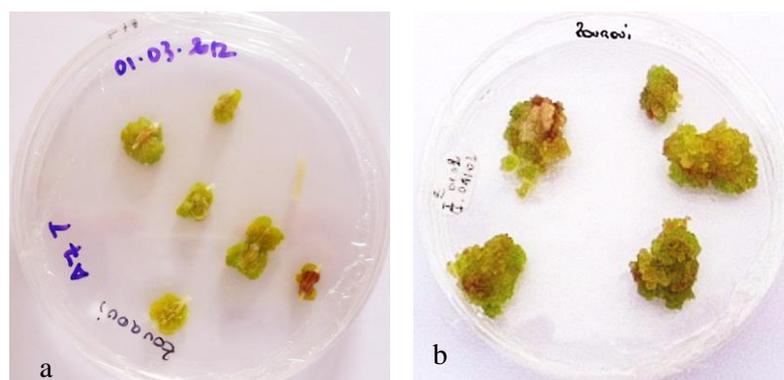
### 2.7. Analyse statistique

Les pourcentages de cals formés à partir des deux types d'explants des différents génotypes sont analysés grâce au logiciel SPSS (Statistical Package for Social Science software, version 17.0). Une analyse de variance est d'abord effectuée pour évaluer la significativité des effets testés, puis les moyennes sont comparées par le test de Duncan afin de déterminer les groupes homogènes à  $\alpha < 0,05$ .

### 2.8. Préparation du pathosystème cal de *Cicer arietinum* / spores d'*Ascochyta rabiei*

Le pathosystème utilisé regroupe un cal ou amas cellulaire de cellules indifférenciées obtenu par culture *in vitro* de tissus végétaux de la plante hôte.

Sur la base des caractères morphologiques (aspect, texture) des cals obtenus, sur les différents milieux, ceux initiés sur le milieu MSm7 sont choisis (Fig.17). Des pièces de d'environ 5mm de diamètre sont transférées, sous hotte à flux laminaire, sur le milieu de culture modifié MS<sub>m</sub> dépourvu de régulateurs de croissance à raison de trois par boîte, puis inoculés avec 10µl de la suspension de spores fraîchement préparée selon le protocole décrit précédemment, par dépôt sur leur sommet. Des cals inoculés avec la même quantité d'eau distillée stérile sont utilisés comme témoin. Pour le génotype Bousahla l'inoculation et le suivi de l'interaction ne sont pas effectués vu le nombre insuffisant de cals obtenus.



**Figure 17.** Aspect des cals choisis pour l'inoculation

## 2.9. Étude de la confrontation du pathosystème cal/ suspension de spores

L'interaction entre l'hôte et son parasite est suivie sur le plan macroscopique, histologique et biochimique.

- Le suivi macroscopique des cals inoculés pour évaluer les modifications extérieures.
- L'étude microscopique par des observations cytologiques et histo-cytostohimiques permet d'une part le suivi de l'infection et aussi la mise en évidence de substances accumulées *de novo* inhérentes à la réaction.
- L'étude biochimique permet d'analyser l'évolution de quelques marqueurs choisis, à savoir les sucres solubles totaux, protéines totales, polyphénols et flavonoïdes, ayant un rapport direct avec les réactions de l'hôte et du parasite suite à la confrontation.

Des échantillons sont prélevés pour l'étude histologique après 0, 12, 24, 48, 72 heures puis 7 et 14 jours après inoculation (Kadiri *et al.*, 2012). Pour l'étude biochimique, des échantillons témoins et inoculés sont prélevés à 0, 5, 10, 15 et 20 jours de l'inoculation (Kumar *et al.*, 2010).

## 2.10. Étude histologique des cals

L'étude histologique et histochimique des cals traités ou non traités nécessite une fixation des échantillons dans un état aussi proche que possible du vivant par un fixateur approprié puis leur inclusion dans la paraffine.

### Fixation

Des cals prélevés sont fixés pendant 24 heures dans un mélange d'éthanol et d'acide acétique à 3 :1.

### Déshydratation

Elle est obtenue par le passage des échantillons fixés dans des bains d'alcool de degrés croissants:

- Ethanol 95°, 1 h
- Ethanol 95°, 30 min
- Ethanol 100°, 45 min.
- Ethanol 100°, 45 min
- Ethanol 100°, 45 min.

### Imprégnation

Elle vise à éliminer toute trace d'alcool et permet une meilleure pénétration de la paraffine par passage dans des bains de toluène, les étapes sont :

- Toluène et alcool (1 :1, v/v) 30 min
- Toluène pur 2 x 30 min
- Toluène pur 1h
- Toluène et paraffine (1 :1, v/v) 30 min à 56°C

L'imprégnation se fait à chaud dans la paraffine liquide dans une étuve réglée à 56°C (Température du point de fusion de la paraffine). L'échantillon est imprégné dans trois bains successifs de paraffine, d'une heure chacun. Le dernier peut être prolongé toute une nuit. Grâce à ces opérations, la paraffine va remplacer progressivement le solvant dans l'échantillon.

### **Inclusion finale dans la paraffine**

La mise en blocs se fait dans des barres de Leuckart ou dans des cassettes associées à des moules métalliques. La paraffine est coulée à chaud (56 °C), les échantillons sont orientés selon le plan de coupe souhaité et étiquetés. Après leur polymérisation, les blocs sont démoulés.

### **Confection et collage des coupes**

Des coupes sériées de 7 à 10 µm sont confectionnées avec un microtome de type « Spencer 820 ». Les rubans obtenus sont collés sur des lames porte-objets en verre avec de l'eau albuminée. Les lames ainsi préparées sont placées sur une plaque chauffante à 40 °C ce qui permet l'étalement des rubans et la fixation des échantillons.

### **Déparaffinage et réhydratation des coupes**

Avant leur coloration les coupes doivent être débarrassées de la paraffine pour permettre la pénétration des colorants aqueux dans les échantillons. Le déparaffinage se fait selon les étapes suivantes :

- Bain de toluène pur pendant 20 min sur plaque chauffante à 50 °C
- Bain de toluène pendant 10 min
- Bain de toluène pendant 10 min
- Bain d'éthanol 100° pendant 15 min
- Bain d'éthanol 100° pendant 15 min
- Bain d'un mélange d'éthanol absolu et de formol (4 :1) 5 min
- Rinçage à l'eau courante.

Ainsi préparées, les lames sont conservées à l'abri de la poussière puis colorées.

## **2.11. Coloration des coupes**

Les différentes observations microscopiques et prise de photos sont réalisées à l'aide d'un microscope optique de type Olympus et un appareil photo numérique de marque Fuji à 8 pixels. L'étude de l'interaction par les observations microscopiques illustre les effets mutuels de l'hôte et du parasite. Pour cela, plusieurs méthodes de coloration sont utilisées :

### **2.11.1. Coloration au bleu de toluidine O**

Les coupes sériées des calcs sont colorées avec une solution de bleu de toluidine O à 0,05%, préparée selon la méthode d'O'Brien et Feder (1964). Après un rinçage à l'eau puis une déshydratation rapide à l'alcool, les lames sont observées sous microscopie photonique. Le bleu de toluidine O (TBO) est un colorant métachromatique utilisé à la fois comme colorant

histologique et histochimique. Il se lie avec les polysaccharides carboxylés et donne une couleur rose et une couleur bleue à verte avec les polyphénols comme les tanins et la lignine (O'Brian et Feder, 1964 ; Yeung, 1998). Ainsi, les tissus vivants apparaissent colorés en rose, les tissus morts en bleu et les composés phénoliques en bleu verdâtre. Le mycélium apparaît coloré en bleu.

### **2.11.2. Localisation histochimique des phénols**

La mise en évidence des phénols *in situ* dans les cals étudiés se fait par le test nitroso selon la méthode décrite par Allison (2005). Les coupes sériées des cals témoins et inoculés des deux cultivars sensible et résistant de *Cicer arietinum* L. sont placées dans une solution contenant du nitrite de sodium à 10%, l'urée à 20 % et l'acide acétique à 10% (v : v : v). Après 15 minutes, 2 volumes d'une solution de NaOH à 2N sont ajoutés à la solution précédente. Le nitrite de sodium réagit avec l'acide acétique et forme l'acide nitreux qui avec les composés phénoliques forme les dérivés nitroso. L'urée est utilisée comme stabilisateur. Les dérivés nitroso après l'ajout d'une base (hydroxyde de sodium) sont convertis en sels de sodium caractérisés par la couleur jaune ocre à marron ou brun. L'intensité de la coloration est proportionnelle aux taux de composés phénoliques. La lecture se fait immédiatement sous microscopie photonique.

### **2.11.3 Mise en évidence des flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont mis en évidence *in situ* par histochimie selon la méthode décrite par Sore *et al.*, (2012). Les lames déparaffinées sont trempées dans une solution de NaOH à 10% puis observées sous microscope photonique. Les flavonoïdes prennent une couleur jaune.

## **2.12. Étude de l'effet de l'inoculation par la suspension de spores d'*Ascochyta rabiei* sur le profil biochimique des cals**

### **2.12.1. Estimation quantitative des sucres solubles totaux**

Les sucres solubles sont dosés selon la méthode de Dubois *et al.* (1956) où 100 mg de cals frais sont placés dans 1 ml de méthanol à 80%, conservés à 4 °C pendant 24 h pour macération et extraction des sucres puis centrifugés à 5000 rpm durant 10 min. A 500 µl du surnageant récupéré sont ajoutés 500 µl de solution phénolique à 5% et 2.5 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré puis sont maintenus pendant 20 min au bain marie à 28 °C. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à 490 nm. La concentration des sucres solubles totaux dans les différents extraits est déterminée par référence des densités optiques à une courbe étalon établie en parallèle, à partir de solutions de glucose à concentrations croissantes allant de 10 à 100 mg/ml. Les résultats sont exprimés en mg/g de cals frais et représentent une moyenne de trois répétitions.

### 2.12.2. Estimation quantitative des protéines solubles totales

Environ 100 mg de cals frais sont broyés avec 1 ml de solution tampon phosphate 0.06 M, pH 7 dans un mortier refroidi dans de la glace pilée. Ils sont ensuite centrifugés à 5000 rpm (rotation par minutes) pendant 15 min à 4 °C. Le taux de protéines dans le surnageant récupéré est estimé selon la méthode de Lowry *et al.* (1951). Pour la préparation du réactif cuproalcalin, 50 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et 0.1 g de tartrate de sodium sont dissouts dans 10 ml d' $\text{H}_2\text{O}$  distillée. Un volume de 0.1 ml de cette solution est additionné à 5 ml de solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 0.1 mg/l.

A 50  $\mu\text{l}$  d'extrait sont ajoutés 5 ml de réactif cuproalcalin, puis après 10 min, 0.5 ml de réactif de Folin dilué de moitié. La concentration des protéines solubles est déterminée après la lecture de la densité optique par spectrophotométrie à 750 nm puis référée à une courbe étalon établie à partir d'une solution d'albumine de sérum bovin d'une concentration de 10 à 100 mg/ml.

Les résultats obtenus sont les moyennes de trois répétitions exprimées en mg de protéines/g de cals frais.

### 2.12.3. Estimation des polyphénols

Le dosage des polyphénols est effectué selon la méthode de Singleton et Ross (1965) avec le réactif de Folin//Ciocalteu. A 100  $\mu\text{l}$  d'extrait sont ajoutés 500  $\mu\text{l}$  de réactif de Folin//Ciocalteu dilué à 1 : 9 avec de l'eau distillée puis après 2 min d'incubation, 2 ml de carbonates de sodium à 20 % sont ajoutés puis incubés durant 30 min à l'obscurité à température ambiante. Une gamme étalon est établie dans les mêmes conditions avec des solutions d'acide gallique de concentrations allant de 10 à 100 mg/l. L'absorbance est lue par spectrophotométrie à 760 nm et les concentrations de polyphénols totaux sont déterminées par référence à la courbe étalon. Les résultats obtenus sont des moyennes de trois répétitions exprimées en terme de mg équivalent d'acide gallique (EAG)/g cals frais.

### 2.12.4. Estimation des flavonoïdes

Les flavonoïdes totaux sont quantifiés selon la méthode de trichlorures d'aluminium, adaptée par Zhishen *et al* (1999). A 500  $\mu\text{l}$  de chaque extrait sont ajoutés 1500  $\mu\text{l}$  d'eau distillée et 150  $\mu\text{l}$  de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) à 5 %. Après 5 min, 150  $\mu\text{l}$  de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) à 10 % (m/v) sont rajoutés. Après 6 min d'incubation à température ambiante, 500  $\mu\text{l}$  d'hydroxyde de sodium ( $\text{NaOH}$  1M) sont additionnés puis l'absorbance de la solution est mesurée à 510 nm.

Dans les mêmes conditions une gamme étalon est préparée avec des solutions méthanoliques de catéchine à des concentrations variant de 10 à 100 mg/l. La teneur en flavonoïdes totaux des extraits est exprimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) de cals frais. Chaque échantillon est répété trois fois.

### 2.12. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont soumis à une analyse de variance multivariée (MANOVA) pour déterminer l'effet de l'inoculation par *Ascochyta rabiei* chez les différents génotypes de pois chiche *Cicer arietinum* et le temps d'interaction sur le taux de quelques marqueurs biochimiques comme variables dépendantes selon la significativité de la trace de Pillai. Les effets intergroupes sont déterminés par une analyse de variance (ANOVA) et la différence entre les moyennes. Une analyse de variance est d'abord effectuée pour évaluer la significativité des effets testés, puis les moyennes sont comparées par le test post hoc de Duncan afin de déterminer les groupes homogènes à  $\alpha < 0,05$ . Les analyses statistiques sont effectuées avec le logiciel Statistical Package for Social Science software (SPSS 17.0).

Les corrélations linéaires significatives entre les différentes variables sont déterminées avec le même seuil par le test de Pearson  $\alpha < 0,05$ .

### 2.13. Étude qualitative des composés phénoliques des cals

L'estimation de la composition qualitative en composés phénoliques des extraits est réalisée par chromatographie sur couche mince CCM. Cette technique consiste à faire migrer les différents composés sur un support solide de silice SiO<sub>2</sub> (60, F<sub>254</sub>, 0,2 mm, Merck) déposée sur une plaque en aluminium, selon leur polarité dans un système éluant liquide. Différents systèmes sont testés selon le tableau 4.

**Tableau 4.** Systèmes d'élution testés

Système	Proportion en ml
Chloroforme : méthanol	98 :2
Chloroforme : méthanol	15 :1
Chloroforme : méthanol: eau distillée	90 :5 :1
Acétate d'éthyle : acide formique : acide acétique : eau distillée	100 :11 :11 :26
Éthanol : eau distillée : acide formique	18 : 1 : 1
Éthanol : eau distillée : acide formique	10 : 4 : 1
Éthanol : eau distillée : acide formique	58 : 39 : 9
Hexane : toluène : acétate d'éthyle : acide formique	2 : 5 : 2.5 :0.5
Éther de pétrole : acétate d'éthyle	3 :1

Acétone : eau	1 :1
Butanol : acide acétique : eau distillée	60 : 15 : 25
Toluène : acétate d'éthyle : acide formique	10 :4 :1
Toluène : acétate d'éthyle : acide formique	58 :39 :9

L'éluant est versé jusqu'à une hauteur de 1cm dans une cuve à élution fermée hermétiquement jusqu'à saturation en vapeur. Le dépôt de 50 µl d'extrait méthanolique des différents échantillons se fait à l'aide d'une pipette capillaire en verre, puis séché rapidement. La plaque placée verticalement dans la cuve doit demeurer stable et fermée. Lorsque le front du solvant arrive à environ 1 cm de l'extrémité supérieure, la plaque est retirée de la cuve. Le niveau atteint par le solvant est marqué au crayon par un trait fin.

Après migration, les plaques de silice sont séchées à l'air libre, puis révélées sous UV à une longueur d'onde de 254 nm et 365 nm. Les taches visualisées ont été marquées au crayon afin de déterminer leurs facteurs de rétention (RF) dont le calcul se fait selon la formule suivante :

$$RF = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le front du solvant}}$$

Les plaques sont pulvérisées avec une solution éthanolique de Chlorure d'aluminium à 1% puis séchées à température ambiante. Ceci permet la révélation des flavonoïdes, fluorescents en Bleu, ou jaune par excitation à 365 nm (Harborne, 1998; Indhumathi et Mohandass, 2013).

L'examen sous lumière ultra/violette fournit des informations très importantes sur la configuration structurale des molécules isolées. Il apporte des indications particulières concernant les substitutions.

Les différents spots obtenus sont comparés pour déterminer l'éventuelle nature des composés séparés.

Le tableau suivant (Tab.5) résume les relations existant entre la structure d'un composé flavonoïque et sa fluorescence sous UV.

**Tableau 5.** Relation entre la structure des flavonoïdes et leur fluorescence (Markham, 1982)

Couleur du spot	Type de flavonoïde
Noir-brun	Flavonols 5, 6, 7 tri - OH libres Flavonols 5, 7, 8 tri – OH libres
Violet	Flavones 5-OH et 4-OH Flavones 3--OH et 5-OH, 4–OH Flavones ou flavonols 5 –OH avec 4–OH absent ou substitué en 3 Flavones 6- ou 8-OH Chalcones, Dihydroflavonols, flavonones
Bleu fluorescent	Flavones sans 5 - OH libre Flavonols sans 5 –OH libres avec 3-OH substitués Isoflavones sans 5 - OH libre
Jaune terne, jaune orangé	Flavonols 3 -OH libre avec ou sans 5 -OH substitué
Jaune vert brillant	Flavonols 5 –OH libre ou 5 –OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3 –OH libre
Jaune pâle	Dihydroflavonols

#### 2.14. Détection d'activité antifongique dans les extraits de cals par bioautographie directe

La bioautographie directe de Homans et Fuchs (1970) est une méthode de screening microbiologique utilisée pour évaluer l'activité antifongique des différents extraits. Ce protocole est appliqué pour détecter la présence de composés antifongiques. Elle consiste à mettre en contact un inoculum avec un chromatogramme sur couche mince (CCM), préalablement développé à partir de 50µl des extraits à tester sur des plaques de silicagel 60 F<sub>254</sub>. Les chromatogrammes sont développés dans des cuves chromatographiques préalablement saturées d'une phase mobile éthanol absolu/acide formique/eau à un ratio (18:1:1). Une suspension de spores dans le milieu pois chiche liquide (Annexe 3) ajustée à 3x10<sup>5</sup> spores/ ml est pulvérisés sur les plaques tests préalablement bien séchées (Guleria et Kumar, 2006) puis stérilisées pendant 30 min sous UV (Bahr *et al.*, 2016). Celles-ci sont incubées dans une atmosphère humide à 28 °C pendant 07jours. L'activité antifongique est évaluée à l'aide des zones d'inhibition observables à l'œil nu. Les R<sub>f</sub> (rapports frontaux) correspondants sont calculés puis comparés à ceux des fractions de l'analyse qualitative.

# Résultats

---

### 3. Résultats

#### 3.1. Initiation de la callogenèse

Les milieux testés avec les différentes balances hormonales ont induit la formation de cals à partir des explants d'entrenœuds de folioles et des cotylédons chez les 7 géotypes de *Cicer arietinum* testés, ICC 3996 C, Zouaoui, INRA 199, Bousahla, Flip 82 150 C, ILC 483 et ILC 200. Dès la première semaine, les explants mis en culture montrent une réactivité aux milieux de culture. Les explants de tiges se gonflent et forment de petits amas de cellules ou cals. Pour les folioles, cette formation peut concerner toute la surface du limbe, le long de la nervure principale ou les zones d'excision. Dans le cas des cotylédons, de petits amas de type cal se forment sur le pourtour des explants en contact avec le milieu de culture.

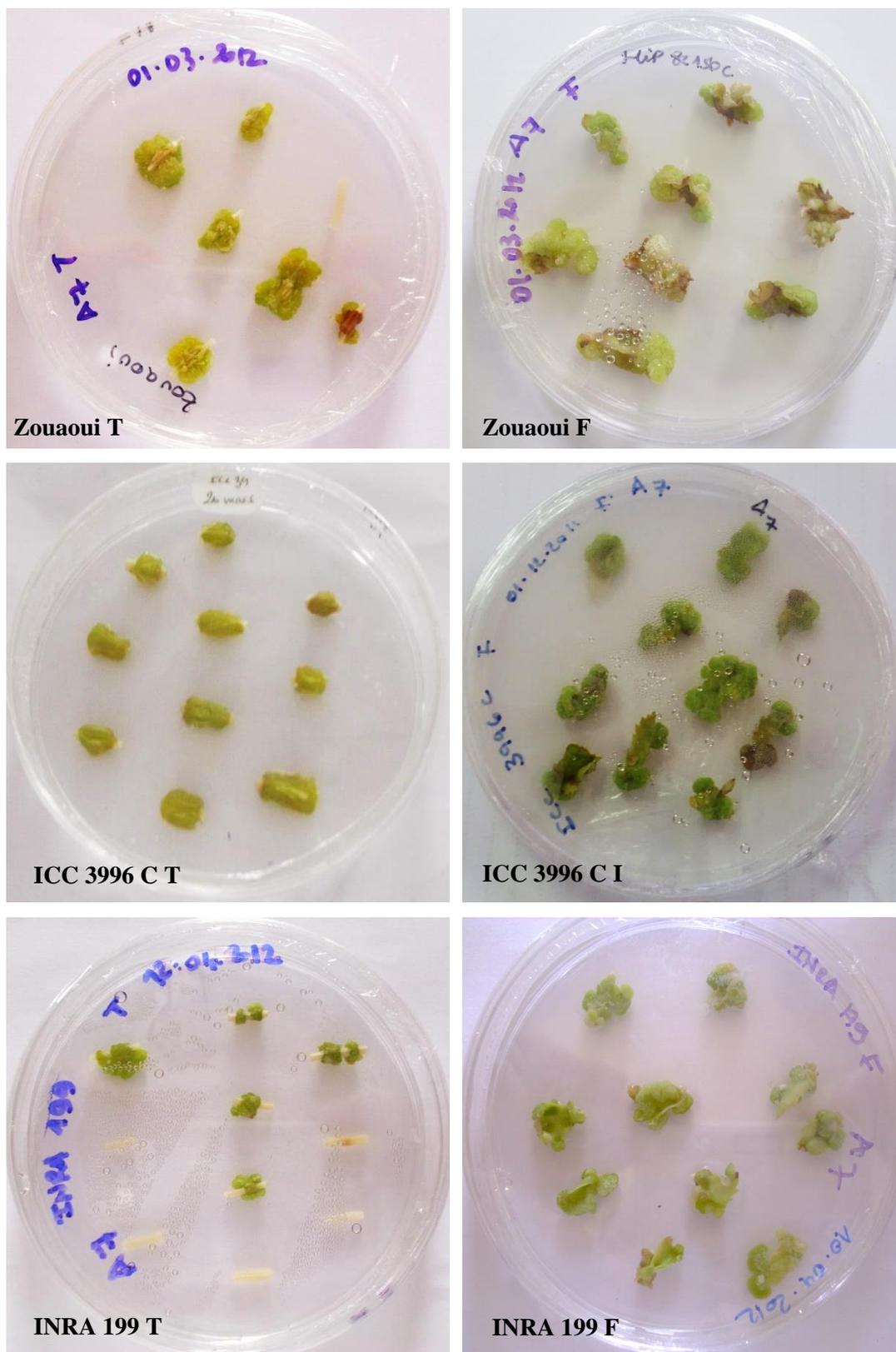
Après quatre semaines, les cals formés présentent des caractéristiques variables avec différentes couleurs et textures selon la combinaison hormonale ajoutée au milieu (Tab.6)

**Tableau 6.** Caractéristiques de la callogenèse chez *Cicer arietinum*

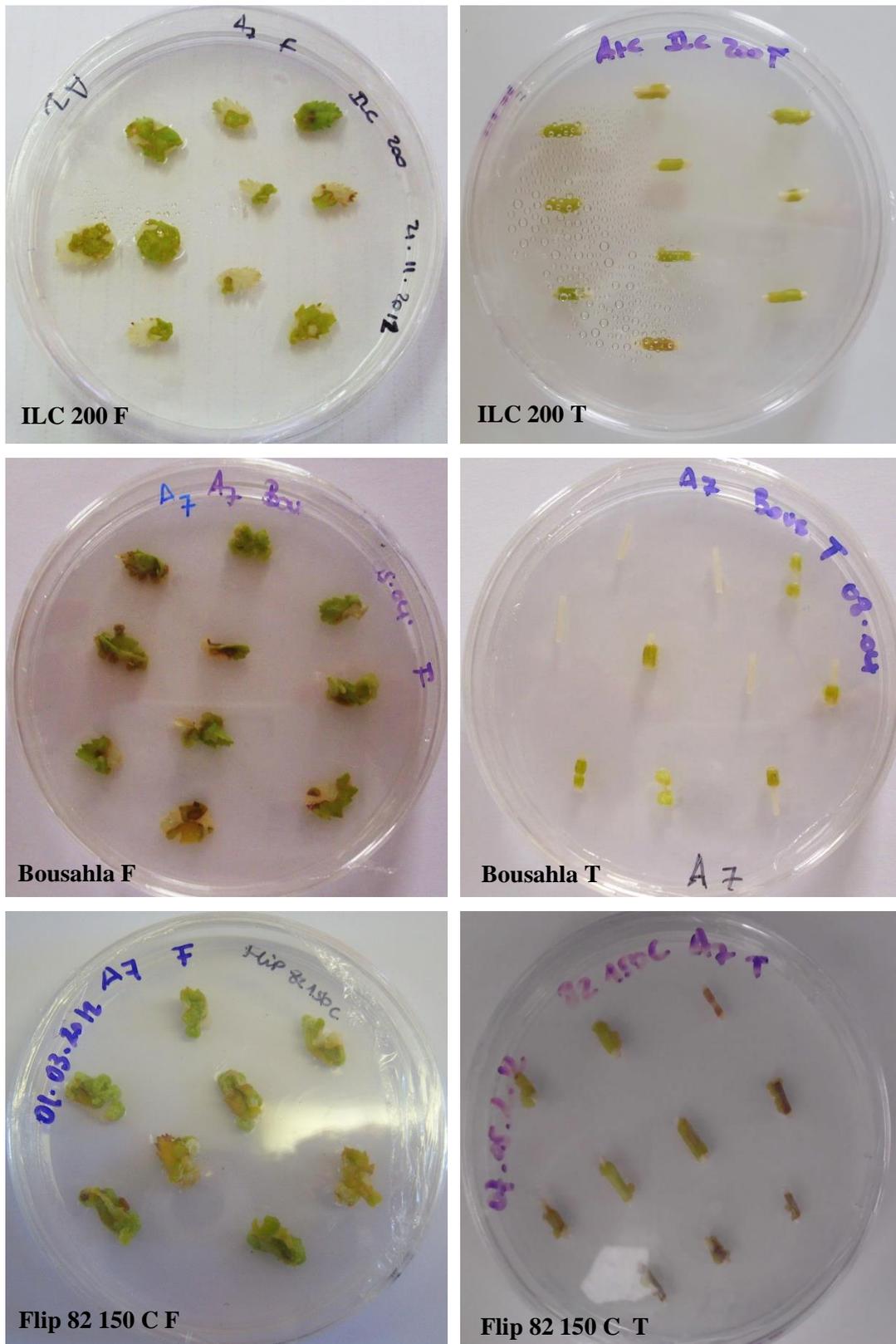
Milieux	Composition hormonale (mg/l)			Intensité de la callogenèse (30j)	Couleur des cals	Texture des cals
	2,4-D	ANA	BAP			
MS1	2	//	//	++	Beige	Hydratée
MS2	4	//	//	-	-	-
MS3	8	//	//	-	-	-
MS4	16	//	//	-	-	-
MS5	//	0,5	//	+	Jaune à Vert -	Dure
MS6	1	//	//		-	-
MS7	0,5	//	1	++++	Jaune à Vert	Dure
MS8	1	//	1	-	-	-
MS9	1	//	2	-	-	-
MS10	2	//	2	-	-	-
MS11	2	0,5	//	++	Beige	Hydratée
MS12	4	0,5	//	-	-	-
MS13	4	//	4,5	-	-	-
MS14	//	0,5	2,25	+++	Vert foncé	Dure
MS15	//	0,5	4,5	-	-	-
MS16	//	0,5	1	-	-	-
MS17	//	0,5	2	-	-	-

- : Absence de callogenèse, + : <20%, ++ : 20-30%, +++ : 40-50%, +++++ > 50% de cals formés.

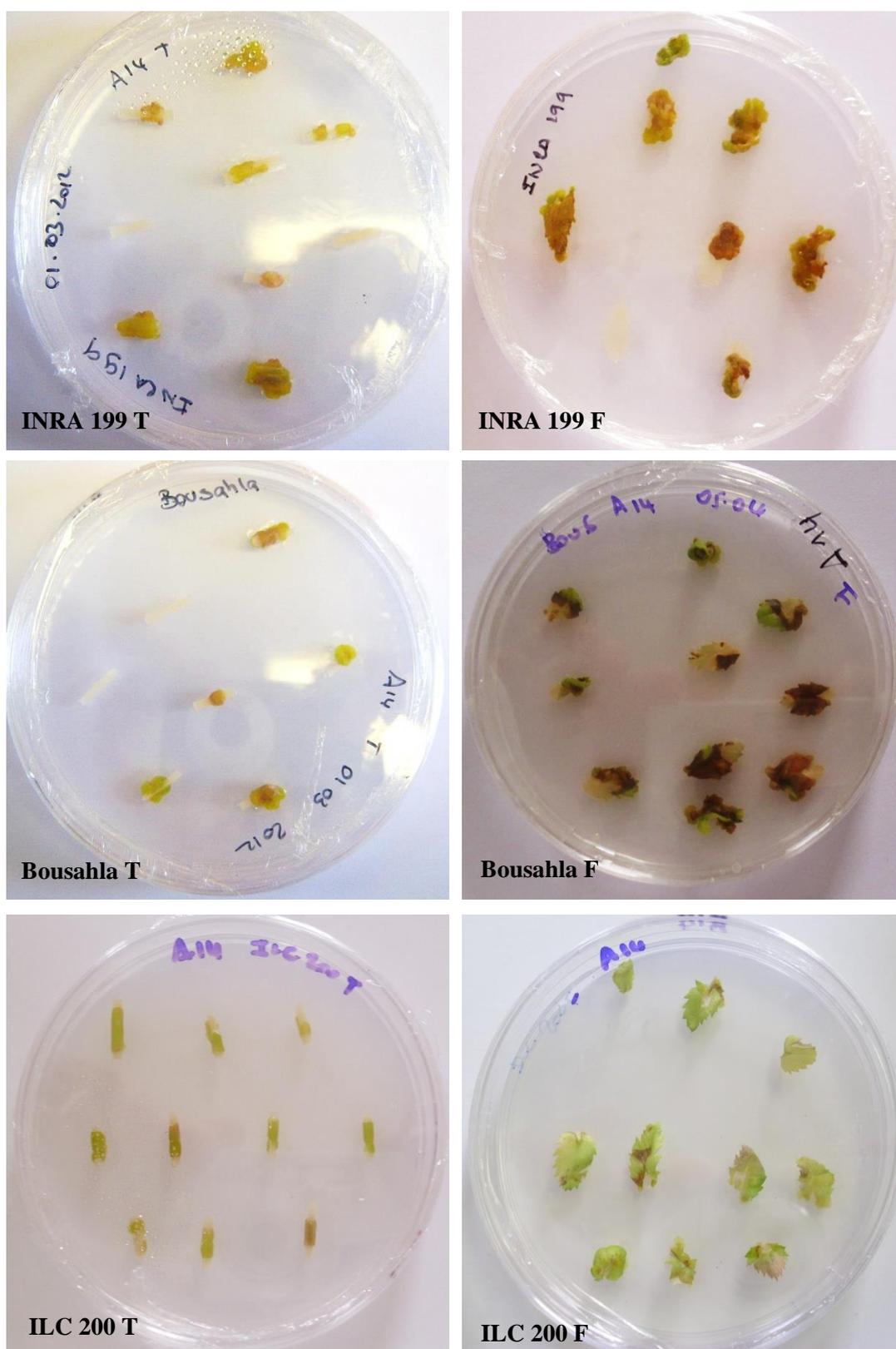
Les cals formés sur le milieu MS7 (Fig. 18, Fig 19) sont friables de couleur jaune à verte, durs vert foncé sur MS14 (Fig.20, Fig. 21); petits hydratés, beiges sur MS1, MS11 et petits beiges à surface dure sur le milieu MS5 (Fig. 22).



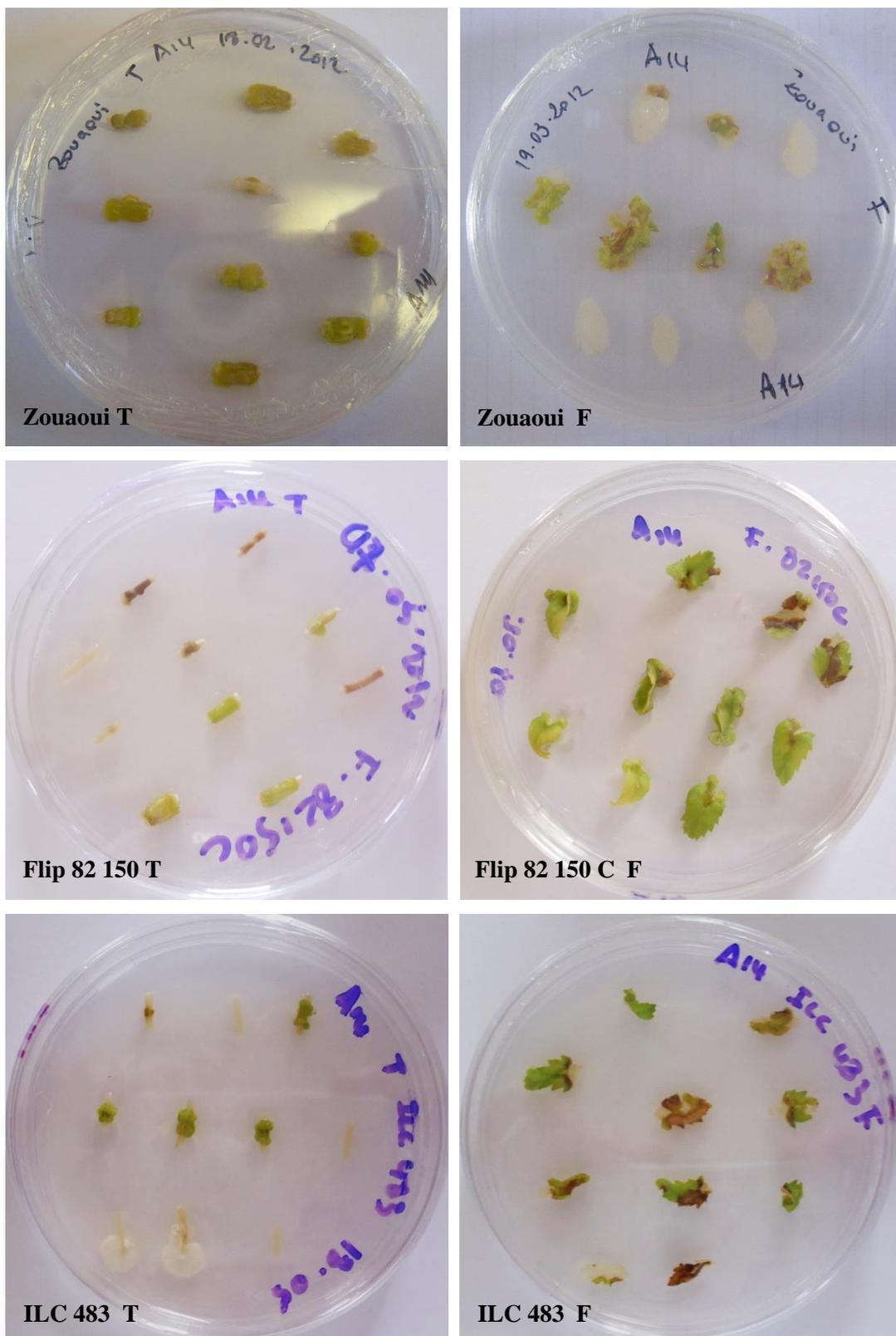
**Figure 18.** Cals obtenus après un mois de culture des tiges (T) et folioles (F) des génotypes Zouaoui, ICC 3996 C et INRA 199 sur le milieu MS additionné de 2,4-D/BAP (0,5/1 mg/l).



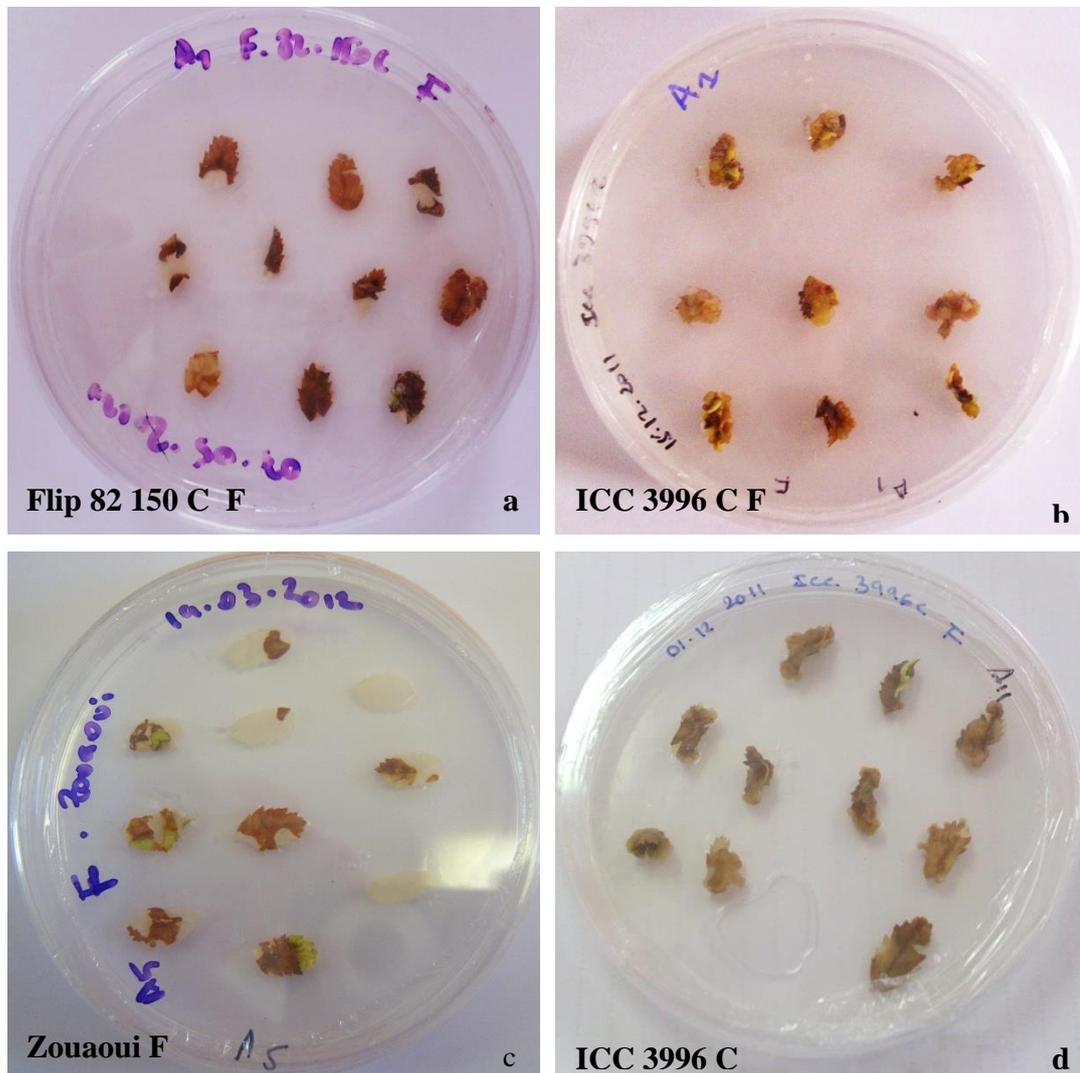
**Figure 19.** Cals obtenus après un mois de culture des folioles (F) et tige (T) des génotypes ILC 200, Bousahla et Flip 82 150 C sur le milieu MS additionné de 2,4-D/BAP (0,5/1 mg/l).



**Figure 20.** Cals obtenus après un mois de culture des tiges (T) et folioles (F) des génotypes INRA 199, Bousahla et ILC 200 sur le milieu MS additionné de ANA/BAP (0,5/2,25 mg/l).



**Figure 21.** Cals obtenus après un mois de culture des tiges (T) et folioles (F) des génotypes Zouaoui, Flip 82 150 C et ILC 483 sur le milieu MS additionné de ANA/BAP (0,5/2,25 mg/l).

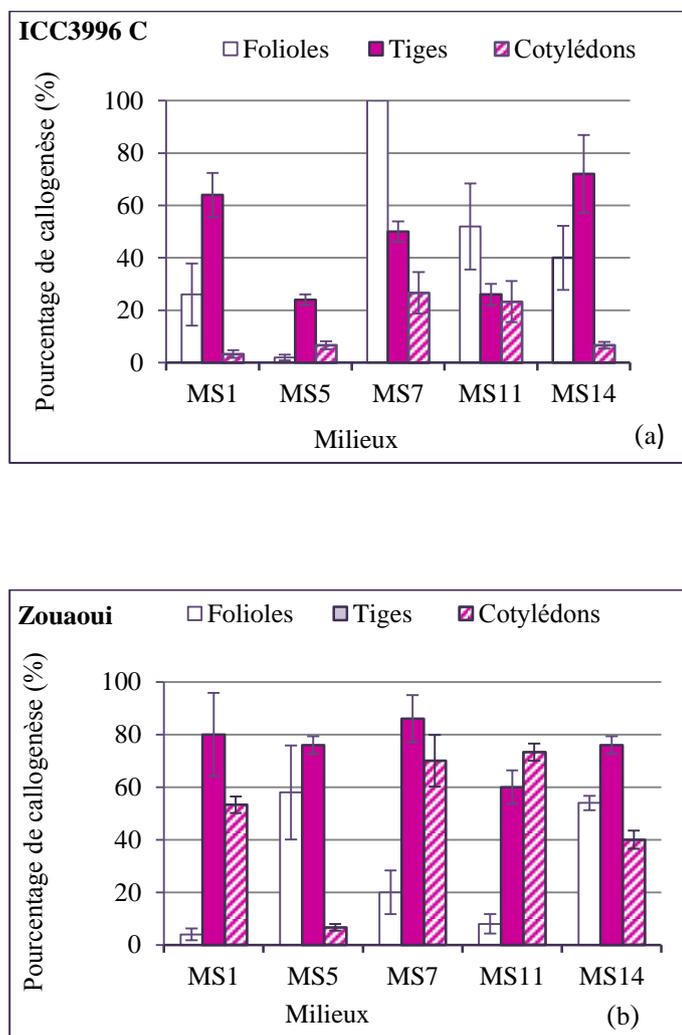


**Figure 22.** Aspect des explants de folioles (F) et de tiges (T) nécrosés après un mois de culture sur le milieu MS additionné de 2,4-D (2 mg/l); (a, b), ANA (0,5 mg/l); (c) et 2,4-D/ANA (2/ 0,5 mg/l); (d).

Sur les milieux MS2, MS3, MS4 MS6, MS8, MS9, MS10, MS12, MS13, MS15, MS16 et MS17 aucune formation de cal n'a été observée. Pour l'étude statistique de l'effet des différents milieux sur la callogenèse des différents génotypes de pois chiche testés, seuls les résultats obtenus sur les milieux MS1, MS5, MS7, MS11 et MS14 sont pris en considération. Une différence significative est observée dans la réponse à l'initiation de la callogenèse dans le cas des entrenœuds, folioles et cotylédons des 07 génotypes.

Les résultats obtenus montrent que les explants du génotype ICC 3996C (Fig. 23a) montrent des réponses variables sur les différents milieux MS1, MS5, MS7, MS11 et MS14. Un taux de callogénèse élevé est obtenu sur le milieu MS7, particulièrement chez les folioles (100%).

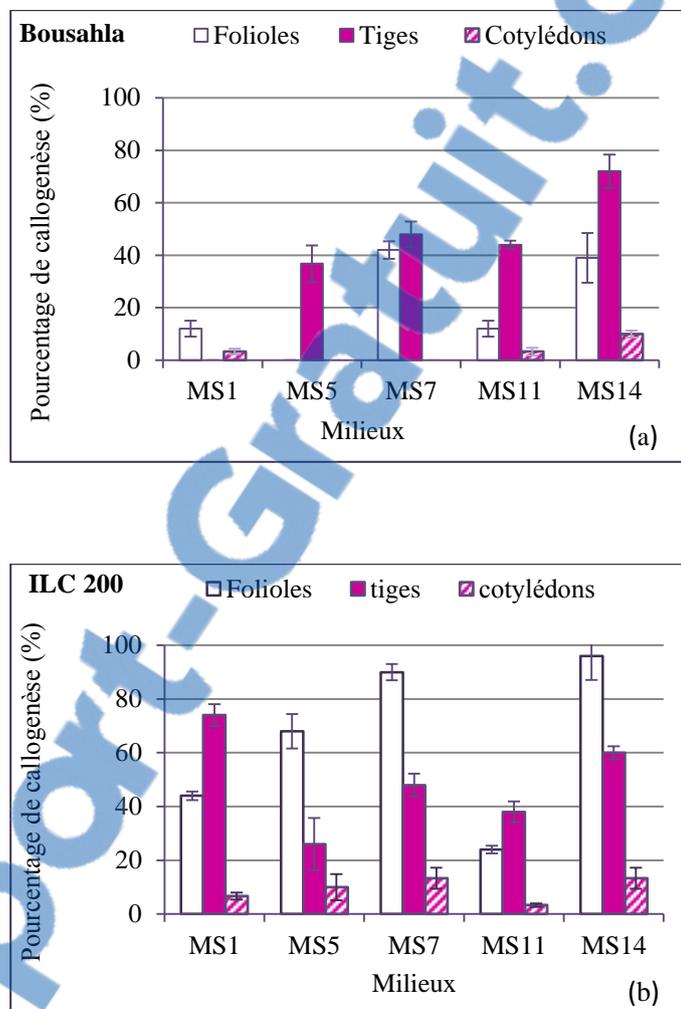
Les explants issus du génotype Zouaoui répondent sur les cinq milieux notamment sur le MS14 où plus de 40% des folioles, tiges et cotylédons forment des cals (Fig.23b).



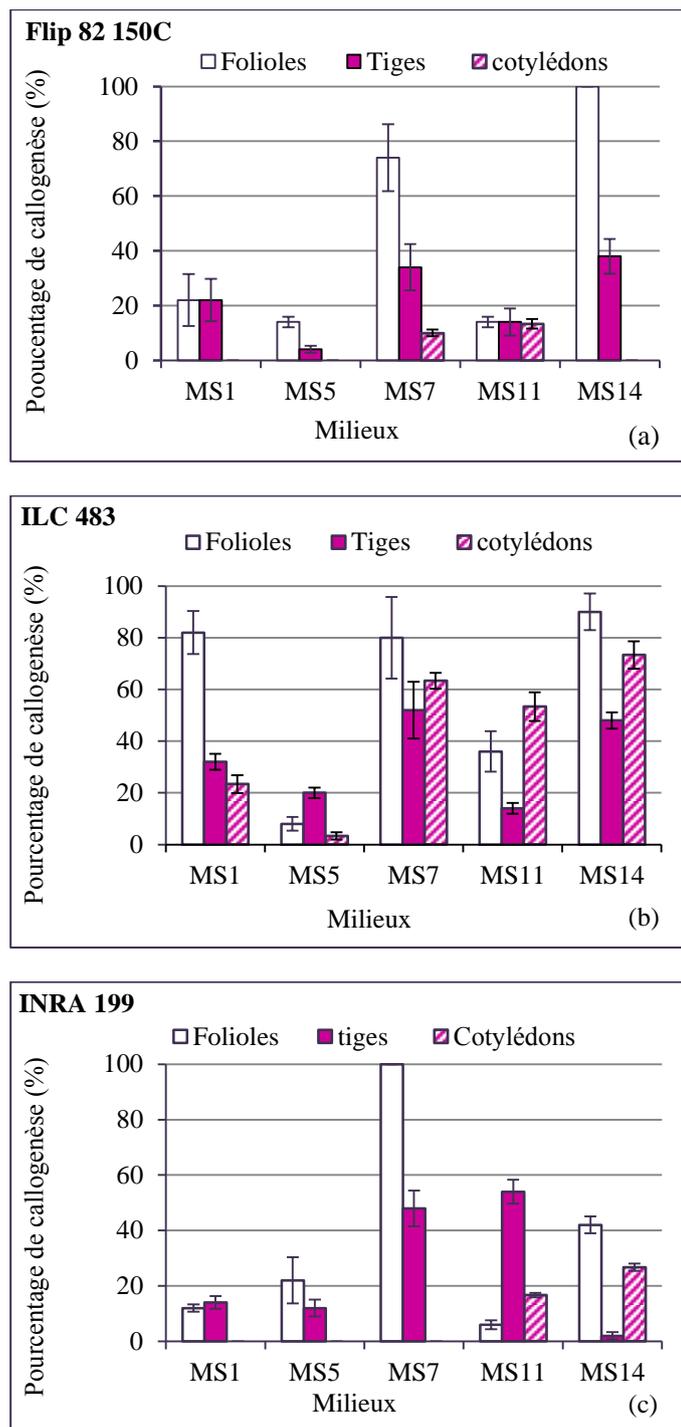
**Figure 23.** Pourcentage de cals formés après 04 semaines de culture des explants de tiges, folioles et cotylédons des génotypes de *Cicer arietinum*, ICC 3996 C (a) ,Zouaoui (b) sur le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) additionné de balances hormonales.

Le potentiel callogène des explants du génotype Bousahla est faiblement exprimé sur les milieux testés. A l'exception des tiges mises en culture sur le milieu MS14, moins de 40% des cals sont obtenus sur les autres milieux (Fig. 24a).

Les résultats obtenus chez le génotype ILC 200 montrent des réponses variables. Plus de 40% des folioles permettent d'obtenir des cals, entre 30% et 80% des tiges, alors que seulement moins de 10% des cotylédons mis en culture forment des cals (Fig.24b).



**Figure 24.** Pourcentage de cals formés après 04 semaines de culture des explants de tiges, folioles et cotylédons des génotypes de *Cicer arietinum*, Bousahla (a), et ILC 200 (b) sur le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) additionné de balances hormonales.



**Figure 25.** Pourcentage de cals formés après 04 semaines de culture des explants de tiges, folioles et cotylédons des génotypes de *Cicer arietinum*, Flip 82 150 C(a), ILC 483(b)et INRA 199(c) sur le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) additionné de balances hormonales.

Chez Flip 82 150 C, la réponse des explants mis en culture est variable. Un pourcentage élevé est obtenu sur le milieu MS14 à partir des folioles, les tiges permettent d’obtenir entre 5% et 40% de cals formés. Les cotylédons du génotype Flip82 150 C expriment un potentiel callogène

relativement bas, moins de 10% de cals sont formés sur les milieux MS11 MS7 et aucune réactivité n'est observée sur MS1, MS5 et MS14 (Fig. 25a).

La mise en culture des explants issus du génotype ILC 483 révèle des réponses variables (Fig. 25b). Les explants de folioles permettent d'obtenir 82% sur le milieu MS1, 78% sur MS5, 90% sur MS7. Le pourcentage de cals formés à partir des segments de tiges varient entre 2% (MS5), 75% (MS14), 55% (MS14) et 30% (MS1). Par ailleurs, le pourcentage de cals obtenus des cotylédons mis en culture varie de 2%(MS5) à 75% (MS14).

La callogenèse chez le génotype INRA199 présente des pourcentages variables. Un taux élevé est obtenu à partir des folioles mis en culture sur le milieu MS7 comparé à MS14, MS5 et MS1. A partir des tiges, le pourcentage de cals formés varie entre 2% (MS14) et 50%(MS11). La réponse des cotylédons est relativement faible, le taux de cals obtenus est 18% sur MS11 et 30% sur MS14 et aucune réponse n'est observée sur les autres milieux (Fig. 25c).

L'analyse de variance (Tab 7.) montre que l'initiation de la callogenèse chez *Cicer arietinum* dépend du génotype utilisé, de la nature de l'explant testé, de la balance hormonale choisie et également de l'effet interactif de ces trois facteurs réunis ( $p < 0,01$ ).

**Tableau 7.** Analyse de variance de l'effet du génotype type d'explant et milieu de culture sur la callogenèse chez *Cicer arietinum* L.

Effet	ddl	Moyenne des carrée	F	P
Génotype (G)	6	10 410,31	18,41	0,00000 **
Explant(E)	2	32 249,44	157,04	0,00000**
Milieu (M)	4	19 643,55	34,74	0,00000**
GxExM	48	1 998,80	3,54	0,00000**

\*\* hautement significatif ( $p < 0,01$ ) à  $\alpha < 0,05$ .

### 3.1.1. Influence du génotype sur la callogenèse

L'analyse de variance montre que le génotype de pois chiche utilisé comme source d'explant influence significativement ( $p < 0,001$ ) la formation de cals. La comparaison des moyennes de pourcentage de cals par le test de Duncan (Tab.8) révèle que les 07 génotypes testés peuvent être réunis dans trois groupes homogènes significativement différents. Le premier groupe comprend le

génotype Zouaoui où 51,02% des explants mis en culture ont abouti à la formation de cals, pourcentage significativement supérieur à  $\alpha < 0,05$  à celui obtenu chez le reste des génotypes testés. Le deuxième groupe homogène regroupe les génotypes ILC 483 (45,24%), ILC 200 (40,98 %) et ICC 3996 C (34,84 %) qui révèlent un pouvoir callogène relativement égal dans ces conditions expérimentales.

**Tableau 8.** Pourcentage des cals obtenus chez les 07 génotypes de *Cicer arietinum* mis en culture sur le milieu MS additionné d'auxines et de cytokinine

Génotype	Taux de callogénèse (%)
Zouaoui	51,02 <sup>a</sup>
ILC 483	45,24 <sup>b</sup>
ILC 200	40,98 <sup>b</sup>
ICC 3996C	34,84 <sup>b</sup>
Flip 82 150C	23,95 <sup>c</sup>
INRA 199	23,69 <sup>c</sup>
Bousahla	21,29 <sup>c</sup>

Sur la même colonne, les valeurs suivies de lettres analogues ne sont passignificativement différentes, selon le test Duncan à  $P < 0,05$ .

Le troisième groupe homogène avec les génotypes Flip 82 150 (23,95 %), INRA 199 (23,69 %) et Bousahla (21,29 %) semble être moins favorable à l'induction de la callogénèse chez *Cicer arietinum* avec des pourcentages significativement inférieurs à ceux obtenus chez les génotypes des autres groupes.

### 3.1.2. Influence des régulateurs de croissance sur la callogénèse chez *Cicer arietinum* L.

Les régulateurs de croissance additionnés au milieu de culture ont un effet significatif sur le déclenchement du processus de formation de cals. Les résultats obtenus indiquent que les combinaisons hormonales 2,4-D (2 mg/l), ANA (0,5 mg/l), 2,4-D/ BAP (0,5/1 mg/l), 2,4-D/ ANA (2/0,5 mg/l) et ANA/ BAP (0,5/2, 25 mg/l), induisent une initiation de callogénèse et les variations observées sont significativement différentes selon l'analyse de variance (Tab. 7).

Les milieux regroupant une auxine (2,4-D ou ANA) et une cytokinine (BAP), permettent d'enregistrer des taux de callogénèse élevés. C'est le cas des milieux MS7 contenant 0,5 mg/l de

2,4-D et 1mg/l de BAP et MS14 avec 0,5 mg/l ANA et 2,25 mg/l de BAP où le pourcentage de cals produits atteint respectivement 50,25 % et 47,42 % (Tab.9).

**Tableau 9.** Pourcentage des cals obtenus chez les 07 géotypes de *Cicer arietinum* selon la balance hormonale ajoutée au milieu de culture MS (Murashige et Skoog , 1962)

Milieu	Taux de callogenèse (%)
MS7	50,25 <sup>a</sup>
MS14	47,42 <sup>a</sup>
MS11	28,03 <sup>b</sup>
MS1	27,52 <sup>b</sup>
MS5	18,93 <sup>c</sup>

Sur la même colonne, les valeurs suivies de lettres analogues ne sont pas significativement différentes, selon le test Duncan à P< 0.05.

Néanmoins, les milieux incluant seulement des hormones de type auxinique tels les milieux MS1 (2 mg/l de 2,4-D) ou MS11 avec 2 mg/l de 2,4-D et 0,5 mg/l d'ANA et MS5 contenant 0,5 mg/l d'ANA, montrent une diminution dans les pourcentages de cals formés avec respectivement 27,52 %, 28,03 % et 18,93 % (Tab. 9).

### 3.1.3. Influence du type d'explant sur la callogenèse chez *Cicer arietinum* L.

L'induction de la callogenèse est étroitement liée ( $p < 0,001$ ) (Tab. 7) à la source d'explants mis en culture. L'étude discriminative des moyennes de cals produits à partir des trois types d'explants étudiés montre que l'expression du potentiel callogène chez les entrenœuds et folioles est élevé comparé aux cotylédons. Ainsi, 42,57 % d'entrenœuds et 42,17 % des folioles mis en culture ont formés des cals et seulement 18,76 % à partir des cotylédons (Tab.10).

**Tableau 10.** Pourcentage des cals obtenus chez les 07 géotypes de *Cicer arietinum* mis en culture sur le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) additionné de régulateurs de croissance

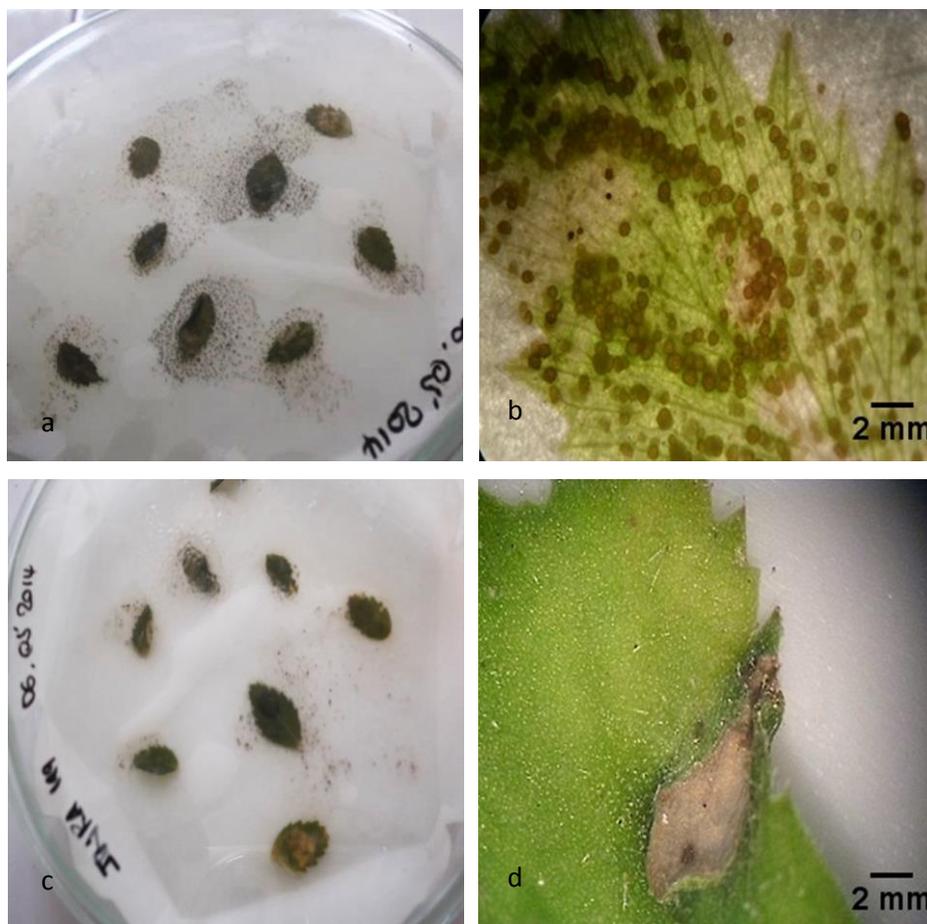
Explant	Taux de callogenèse (%)
Folioles	42,57 <sup>a</sup>
Tiges	42,17 <sup>a</sup>
Cotylédons	18,76 <sup>b</sup>

Sur la même colonne, les valeurs suivies de lettres analogues ne sont pas significativement différentes, selon le test Duncan à P<0,05.

### 3.2. Résultat du test de pathogénicité d'*Ascochyta rabiei*

Les folioles détachées issues des différents génotypes de pois chiche testés présentent des réactions variables après sept jours de l'inoculation. Les génotypes Zouaoui, Bousahla, et ILC 483 présentent des taches qui se développent à partir du point d'inoculation, s'élargissent jusqu'à couvrir entre 25 et 100% de la surface de la foliole (Fig.26 a, b). Elles montrent des cercles concentriques formés de pycnides (Fig.26 b).

Chez les génotypes INRA 199 ICC3996 C et ILC 200, des lésions nécrotiques sont limitées au point d'inoculation et ne forment pas de cercles concentriques de pycnides caractéristiques de l'antracnose (Fig.26c, d).



**Figure 26.** Résultat du test de pathogénicité sur les folioles détachées du génotype Zouaoui (a) avec formation de pycnides arrangés en cercles concentriques(b) et du génotype INRA 199 (c) montrant des lésions limitées (d).

Le nombre de lésions est calculé et les résultats de l'incidence de la maladie et la réaction des génotypes testés sont représentés dans le tableau qui suit (Tab. 11).

**Tableau 11.** Incidence de l'antracnose *in vitro* sur les folioles de *Cicer arietinum* et le type de réaction vis-à-vis du pathogène

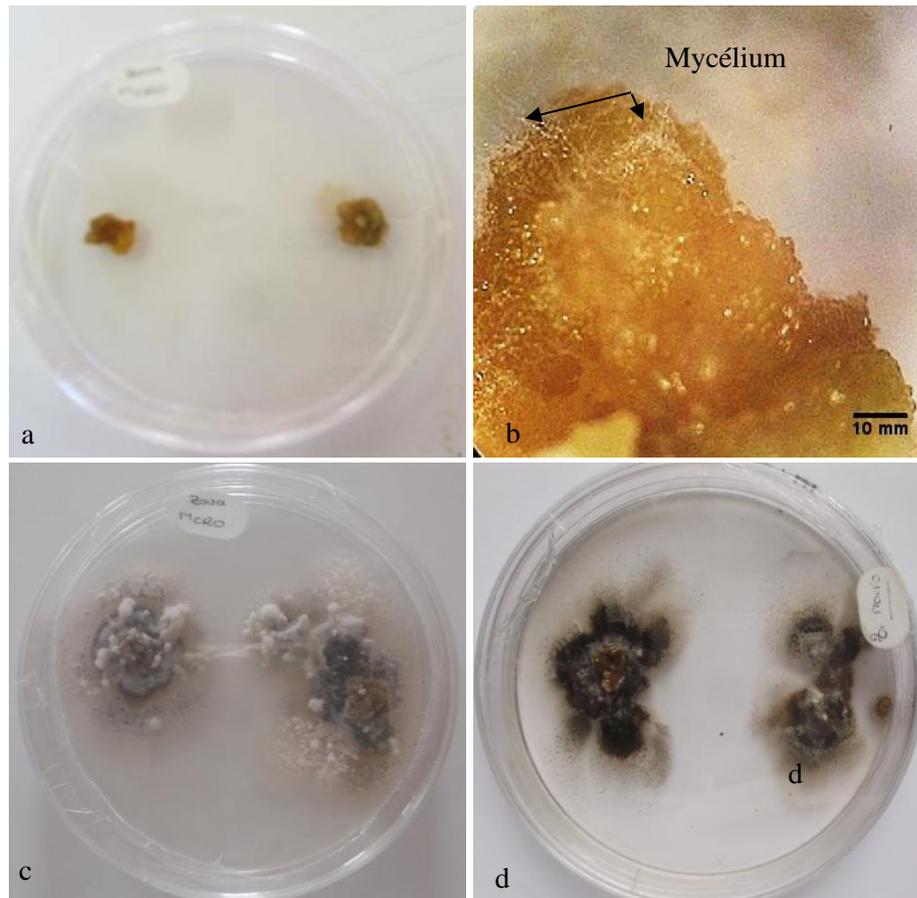
Génotype	Incidence de la maladie (DI %)	Réaction
Zouaoui	53,6 ±0,1	S
Bousahla	52,1± 0,1	S
ILC 483	47,2±0,5	S
Flip82 150C	28,7±0,7	T
ILC200	24,7±0,6	R
ICC3996C	17,3±1	R
INRA 199	8,3±0,9	R

S sensible, T tolérant et R résistant à *Ascochyta rabiei*

Le test de pathogénicité effectué sur des folioles détachées inoculées *in vitro* confirme les caractéristiques données par l'INRA de Sidi Bel Abbes pour les génotypes INRA 199, ICC3996 C, ILC 200, Flip82 150 C et ILC 483. Pour Zouaoui et Bousahla, le pourcentage de folioles présentant les symptômes caractéristiques indique que l'incidence de l'antracnose est respectivement de 53,6% et 52,1% ce qui permet de les définir comme génotypes sensibles à *Ascochyta rabiei*.

### 3.3. Suivi macroscopique de l'interaction cals de *Cicer arietinum*/ *Ascochyta rabiei*

Les cals témoin et inoculés par une suspension de spores sont suivis quotidiennement pour repérer les modifications macroscopiques qui peuvent apparaître. Durant les premières quarante-huit heures, aucun changement n'est visible à l'œil nu chez tous les génotypes testés (Fig 27a). A 72 h, des hyphes apparaissent sur les cals des génotypes ILC 483 et Zouaoui (Fig. 27 b). Le mycélium s'y développe et les recouvre totalement au septième jour (Fig.27 c). Après 14 jours, les cals présentent un aspect nécrosé (Fig 27d). Cependant, pour les génotypes INRA 199, ILC 200, ICC 3996 C et Flip 82 150 C, les hyphes ont une croissance lente et ne sont visibles qu'après 96 h.

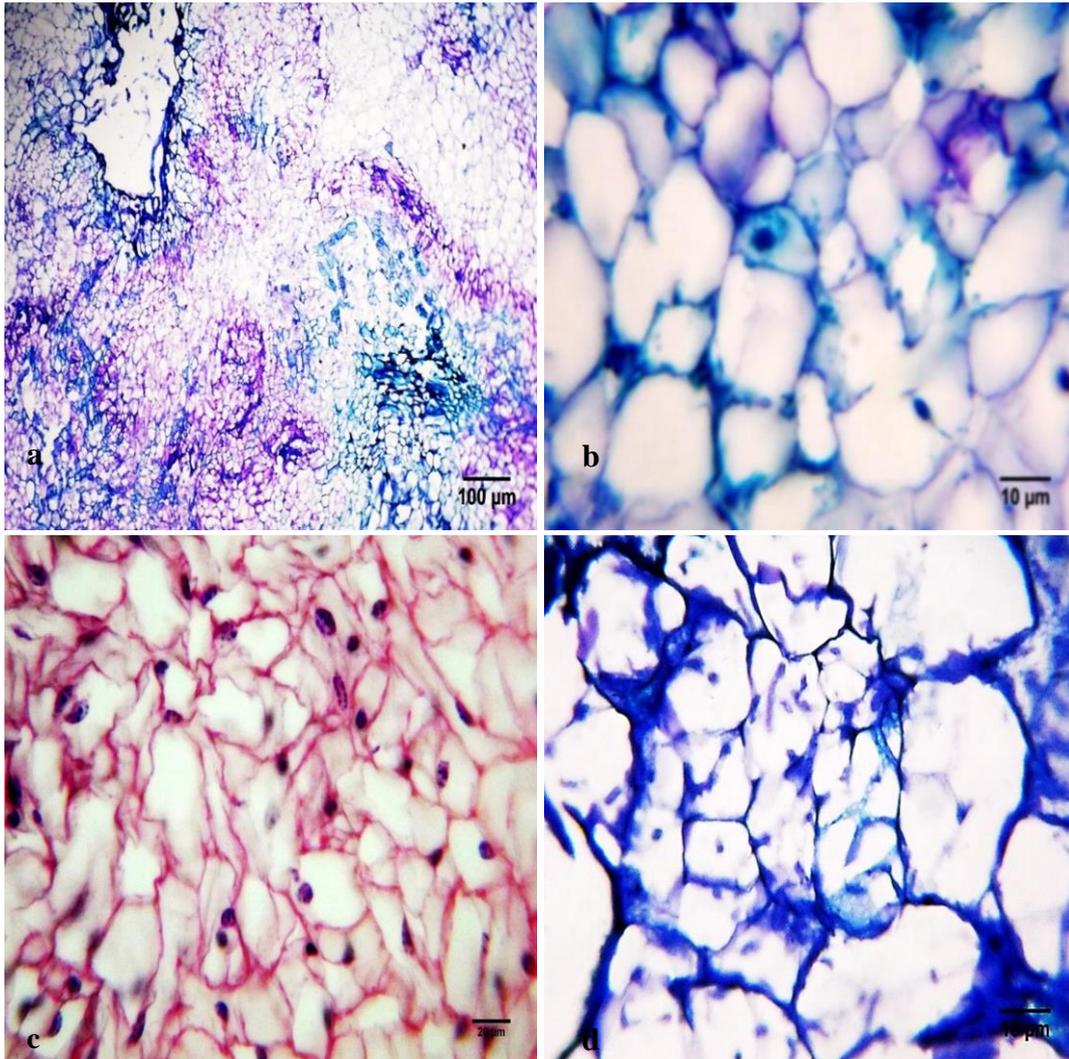


**Figure 27.** Aspect macroscopique des cals inoculés du génotype Zouaoui après 48h (a), 72h (b), 07jours (c) et 14jours (d).

### 3.4. Suivi microscopique de l'interaction cals de *Cicer arietinum*/ *Ascochyta rabiei*

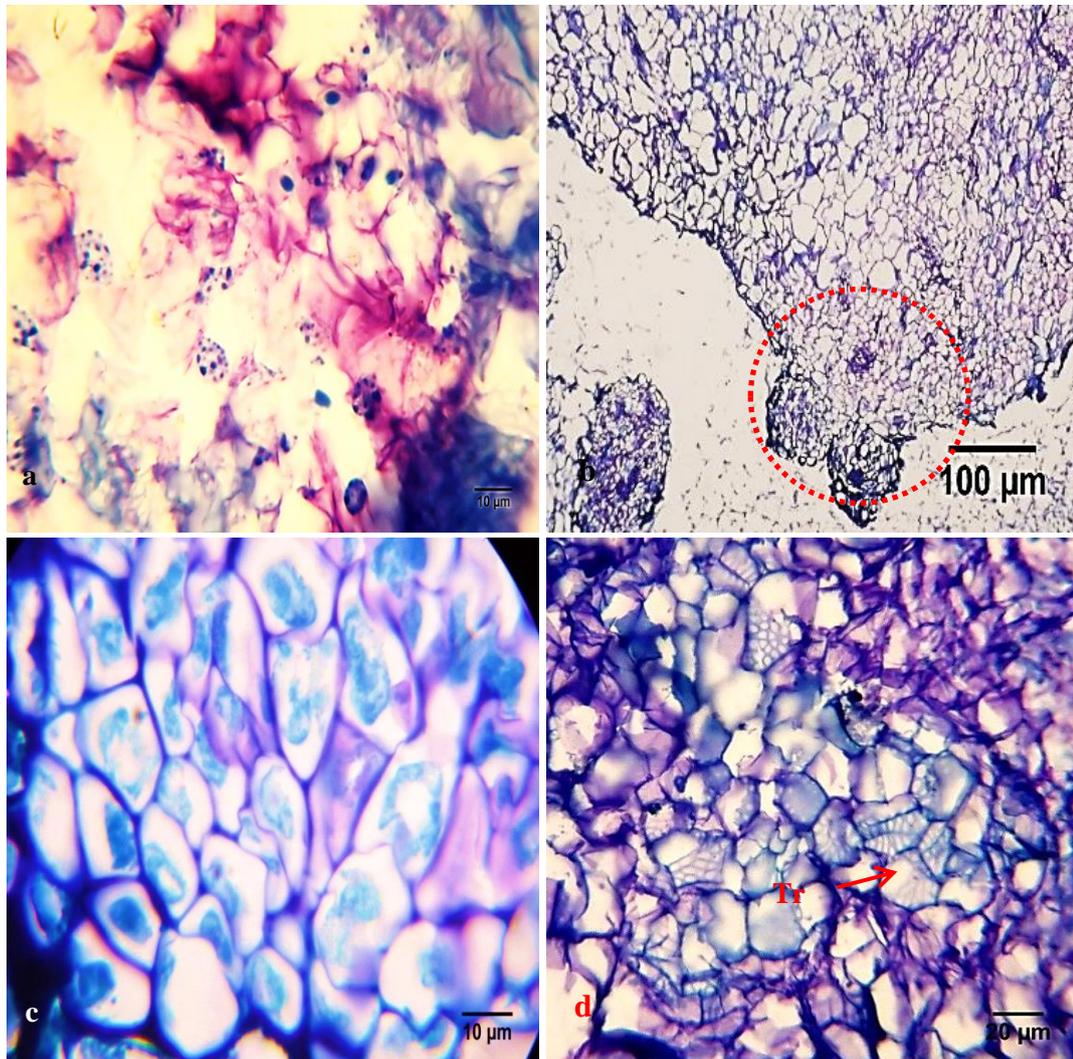
#### 3.4.1. Étude Histologique des cals témoins

Les examens histologiques des coupes sériées montrent que les cals non inoculés sont constitués de tissus néoformés constitués d'une masse fondamentale parenchymateuse (Fig.28 a). Elle est formée de grandes cellules souvent anucléées et petites cellules (Fig. 28 b, c). Il est noté également la présence d'amas de cellules isodiamétriques de petite taille dont le noyau est fortement contrasté par le TBO (Fig.28 c, d). Leurs caractéristiques cytologiques rappellent celles de cellules méristématiques.



**Figure 28.** Coupes sériées dans un cal témoin de 7 µm d'épaisseur colorées par le bleu de toluidine TBO  
a: Masse fondamentale parenchymateuse, b: cellules parenchymateuses de grande taille anucléées c et d: petites cellules à noyau fortement contrasté par le colorant TBO.

Par ailleurs, il est observé notamment chez le génotype Zouaoui, la présence de cellules polyplôïdes (Fig 29 a). Dans quelques cas, une mise en place d'amas de cellules organisées en nodules sont observées. Ce sont des foyers de petites cellules à gros noyaux qui apparaissent à la périphérie du cal (Fig. 29 c) et qui semble isolés par une paroi légèrement épaissie (Fig 29 b). L'étude histologique des différents cals a permis également l'observation de trachéïdes néoformées (Fig.29 d) présentes en abondance particulièrement chez les génotypes INRA 199 et



ILC 483.

**Figure 29** Coupes sériées dans un cal témoin de 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur colorées par le bleu de toluidine TBO

a: polyplôïdie des cellules, b: amas de cellules organisé en nodule (cercle rouge), c: détail de l'amas montrant des cellules isodiamétriques à grand noyau, d : Nombreuses trachéïdes néoformées (r.)

### 3.4.2. Étude histologique des cals inoculés

Chez les cals issus du génotype INRA 199, les hyphes du pathogène prolifèrent sur la surface du cal, après 48 heures (Fig. 30 b) de l'inoculation avec les spores d'*Ascochyta rabiei* et leur présence se limite à la périphérie des tissus de l'hôte. Les coupes histologiques des échantillons prélevés à 12h dans le but de mettre en évidence les premières interfaces histologiques d'interaction entre le pathogène et l'hôte ne révèlent pas de modifications (Fig 30a).

Après 48 heures plusieurs cellules se colorent en vert par le bleu fluorescent de toluidine O ce qui révèle la présence de composés phénoliques (Fig.30d, e). Il est remarqué qu'elles forment une zone qui délimite la région où prolifère le pathogène et au-delà de laquelle sa croissance semble être inhibée. La prolifération du mycélium, s'intensifie après 72 heures (Fig. 30c) et reste limitée à la périphérie du cal (Fig. 30f). Il est noté que le mycélium prolifère exclusivement dans l'espace intercellulaire du cal (Fig. 31).

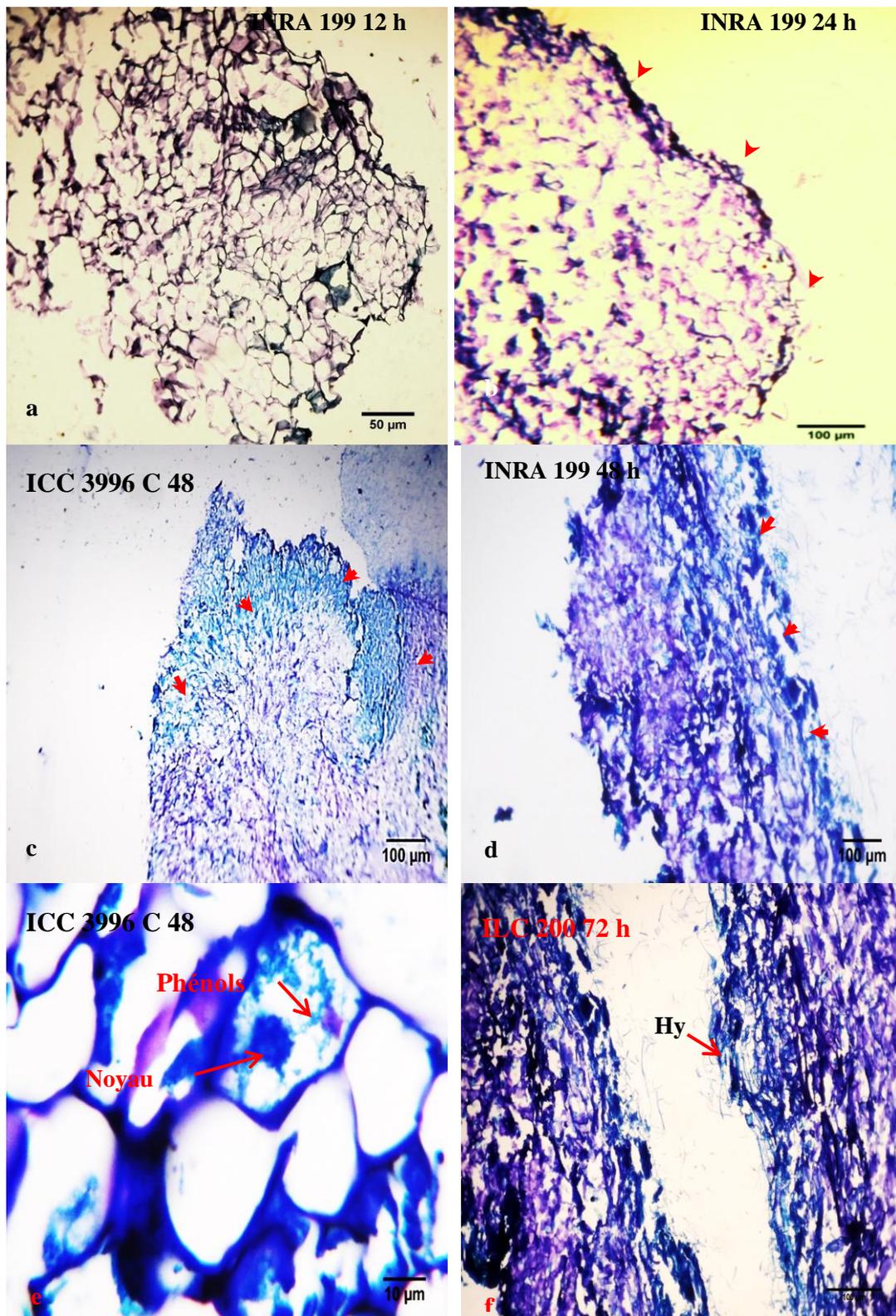
Après 7 jours d'inoculation, le pathogène forme quelques pycnides qui libèrent plusieurs spores au quatorzième jour (Fig 32).

Les coupes histologiques des cals issus du génotype ILC 200, ICC3996 C révèlent des résultats similaires à ceux observés chez INRA 199. En effet la prolifération du mycélium d'*Ascochyta rabiei* semble se limiter à la périphérie du cal et comme précédemment, les cellules de l'hôte réagissent par l'accumulation de composés de nature phénolique qui se colorent en vert par le TBO.

Ce phénomène est également observé dans le cas des cals du génotype Flip 82 150 C qui semblent également réagir par une accumulation de composés phénoliques et une limitation de la croissance mycélienne du pathogène à la périphérie durant les premières soixante-douze heures. Toutefois, au septième jour un nombre plus élevé de pycnides y est formé.

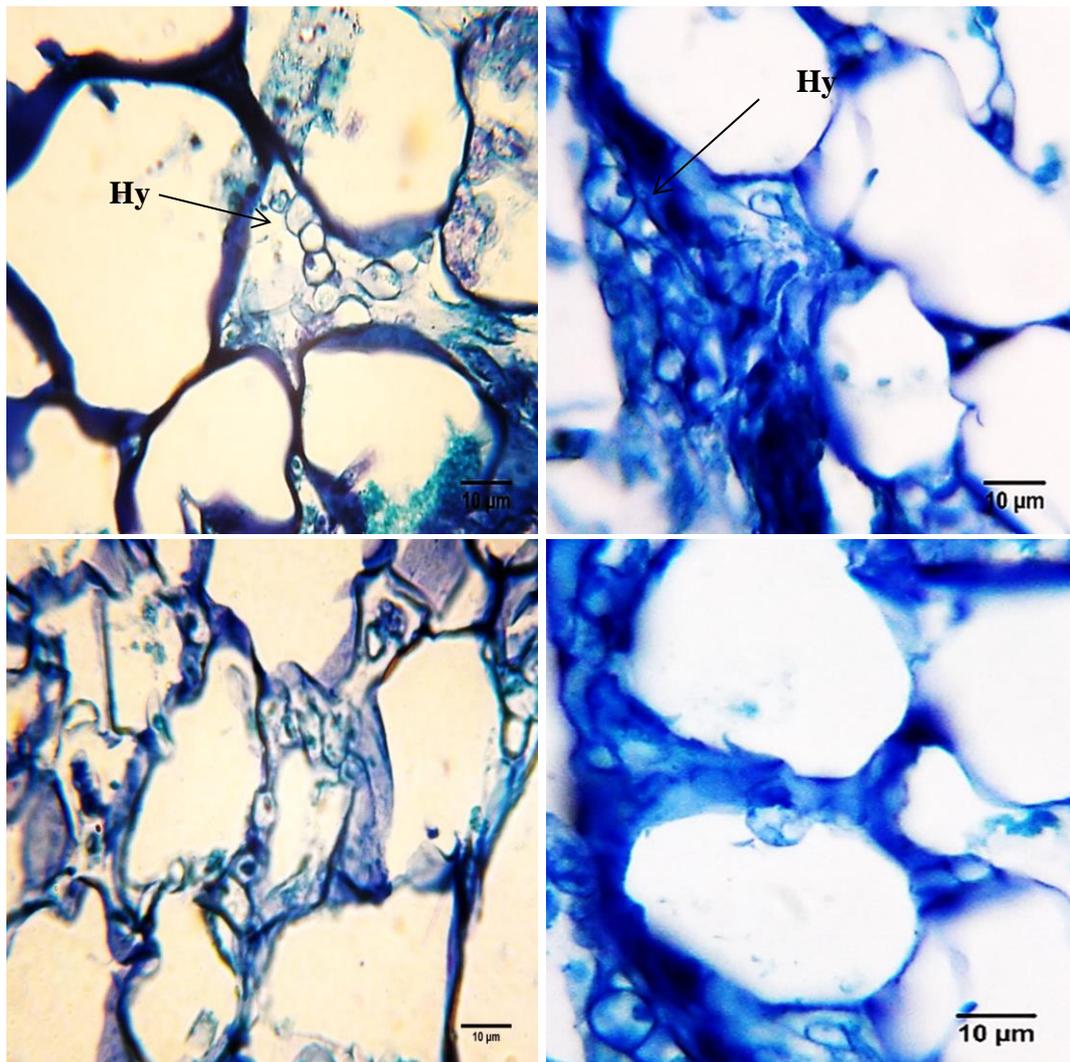
Les cals issus des génotypes ILC 483 et Zouaoui inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* présentent un profil différent. Le mycélium formé après la germination des spores colonise le cal à la périphérie et en profondeur dès les premières soixante-douze heures. Ainsi, un développement rapide et abondant des hyphes est remarqué et au septième jour 7ème jour de l'infection, le pathogène forme un grand nombre de pycnides et de pycnidiospores (Fig 34.a). Des cellules dont le contenu de nature phénolique se colore en vert avec le bleu de toluidine O sont également observées.

A maturité, les pycnides libèrent de nombreuses spores (Fig 34.b) majoritairement unicellulaires et occasionnellement bicellulaires (Fig 34.c) dans un cirrhe (Fig 34d).



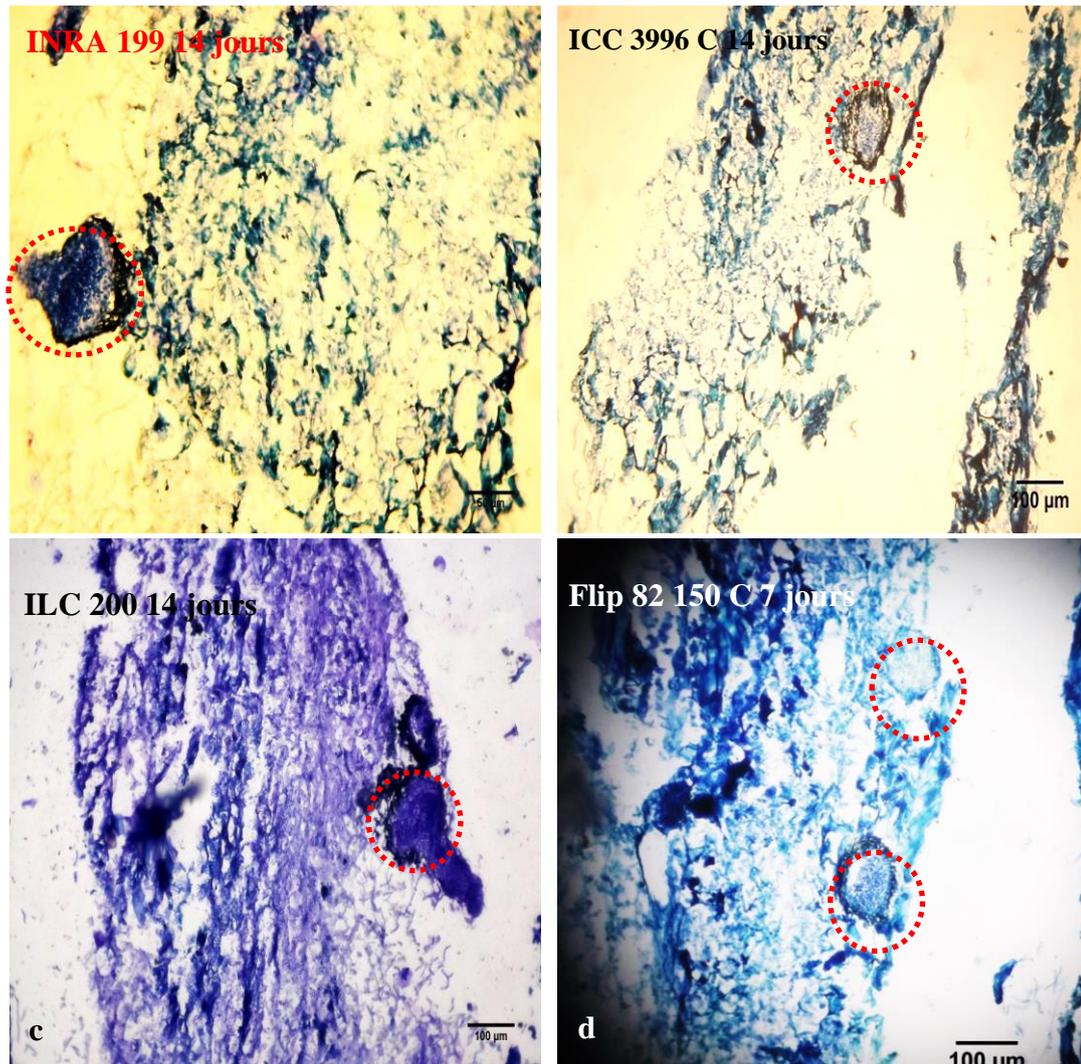
**Figure 30.** Coupes sériées de 7 µm d'épaisseur des cals inoculés, colorées au le bleu de toluidine TBO

a: Histologie après 12 h d'inoculation, b : prolifération du mycélium à la périphérie du cal (têtes de flèches), c; d : formation de la boundary zone (têtes de flèches), e : détail des cellules de la boundary zone, f : prolifération du pathogène (Hy) à la périphérie et en profondeur du cal.



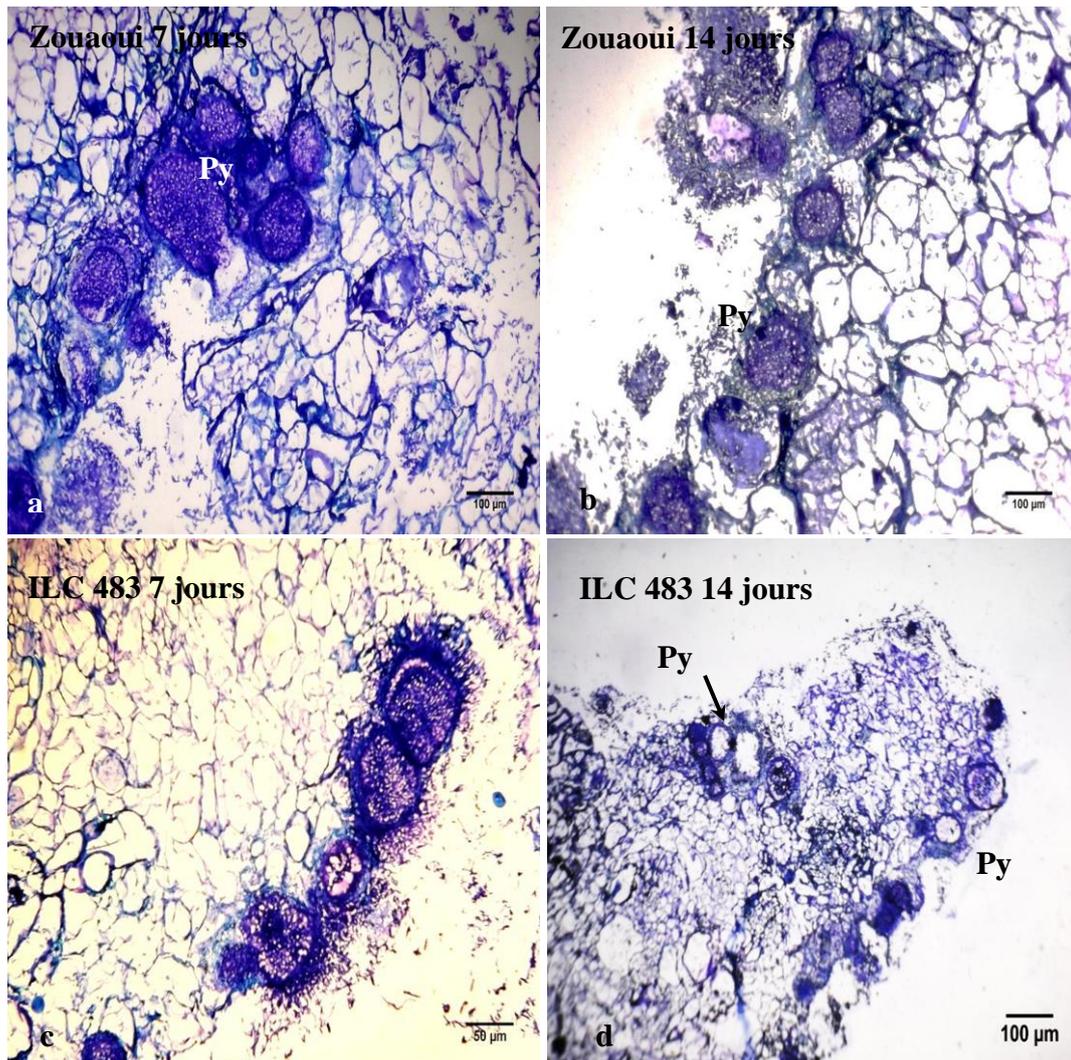
**Figure 31.** Coupes sériées de 7 µm d'épaisseur des cals inoculés, colorées au le bleu de toluidine TBO.

Présence des hyphes (Hy) dans l'espace intercellulaire des cals inoculés.



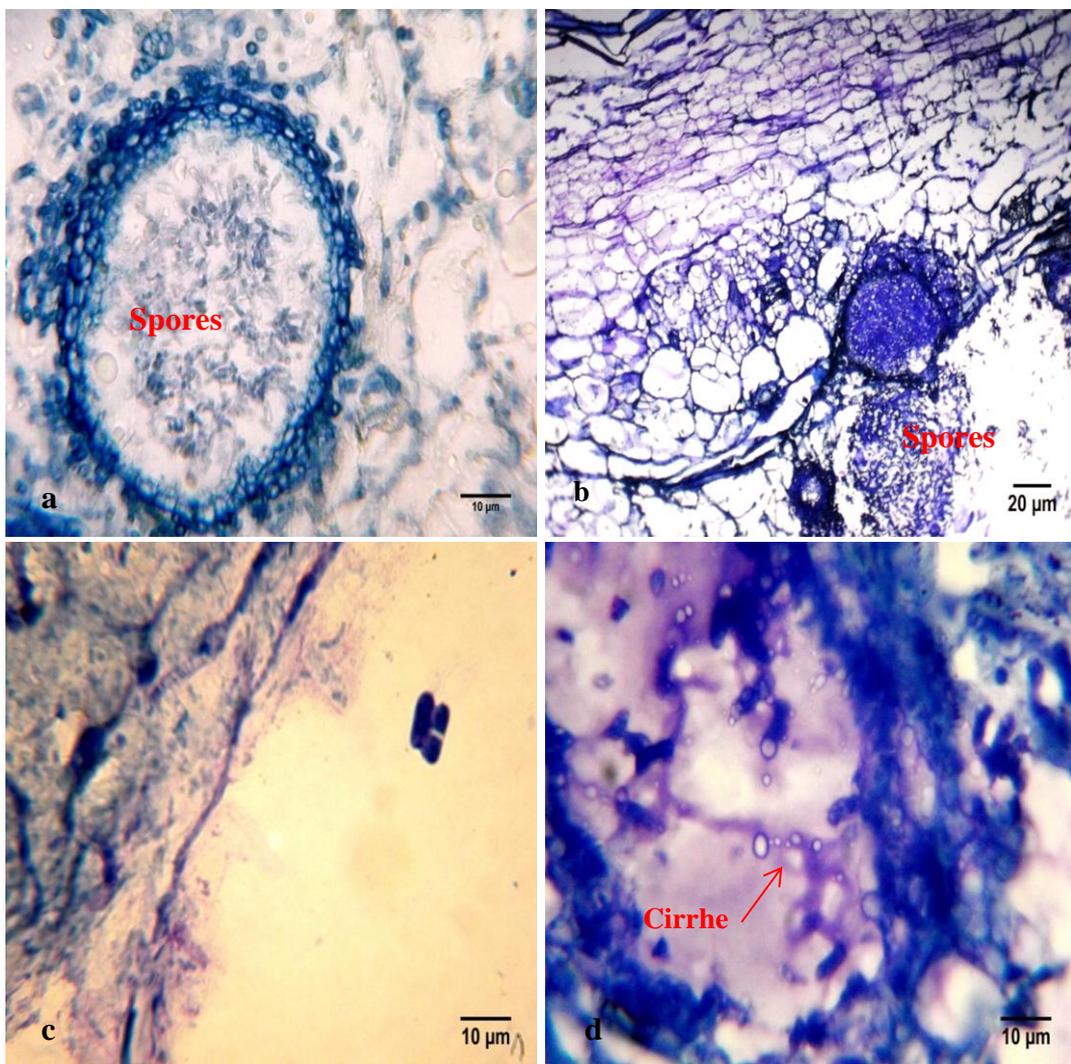
**Figure 32.** Coupes sériées de 7 µm d'épaisseur des cals inoculés, colorées au le bleu de toluidine TBO

Formation de pycnides (cercles) chez INRA 199 (a), ICC 3996 C (b), ILC 200 (c) et Flip 82 150 C.



**Figure 33.** Coupes sériées de 7 µm d'épaisseur des cals inoculés, colorées au le bleu de toluidine TBO

Formation intense de pycnides (Py.) chez Zouaoui (a,b) et ILC 483 (c,d).



**Figure 34.** Coupes sériées de 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur des cals inoculés, colorées au le bleu de toluidine TBO

a: pycnide immature, b: pycnides libérant des spores à maturité, c : spores bi et unicellulaires, d : formation de spores et de cirrhe à l'intérieur d'un pycnide.

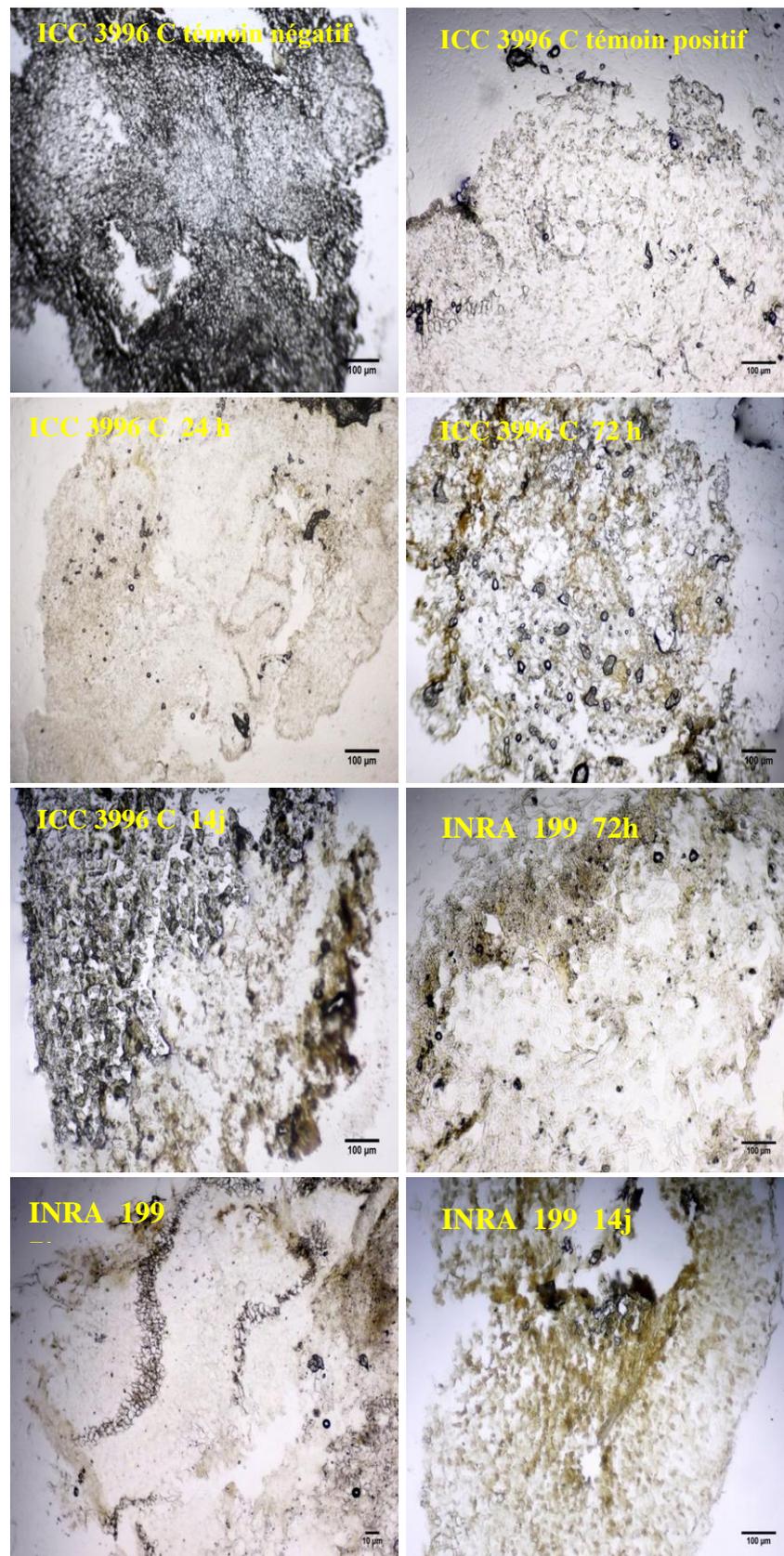
### 3.5. Localisation histochimique des phénols

Le test nitroso spécifique aux composés phénoliques a révélé la présence de ces substances à des taux variables chez tous les cals étudiés. En effet, chez tous les génotypes, la présence de composés phénoliques est observée aussi bien chez les témoins que chez les cals inoculés. Néanmoins, la coloration jaune ocre des phénols est nettement plus intense après confrontation (Fig.35, Fig. 36). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 12

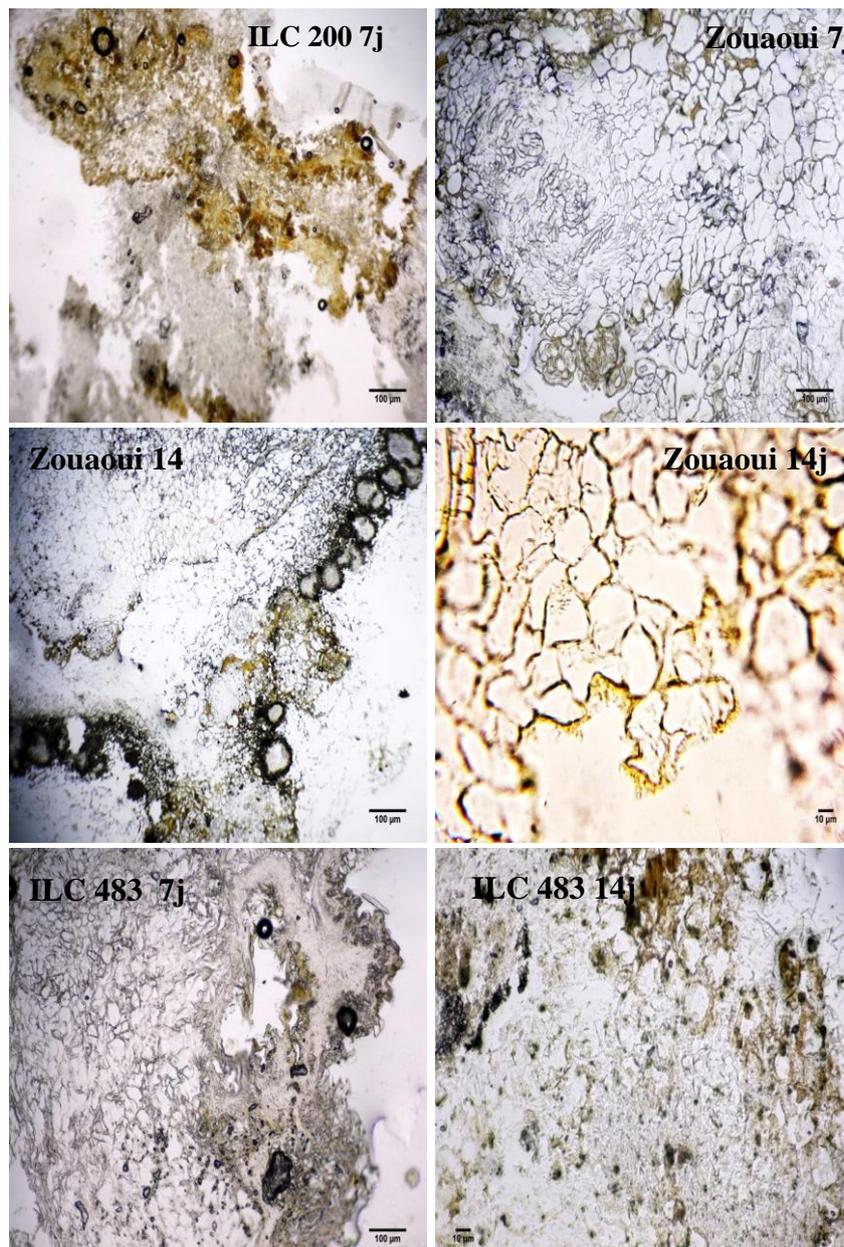
Tableau 12. Intensité des polyphénols produits chez les cals inoculés et témoins

Temps Type de cal		0	12	24	48	72	7j	14j
		Zouaoui	T	+	+	+	+	+
	I	+	+	+	+	+	+	+
ILC 483	T	+	+	+	+	+	+	+
	I	+	+	+	+	+	+	+
Flip 82 150 C	T	+	+	+	+	+	+	+
	I	+	+	+	+	+	++	+
ICC 3996 C	T	+	+	+	+	+	+	+
	I	+	+	+	+	+	+++	+
ILC 200	T	+	+	+	+	+	++	+
	I	+	+	+	+	+	+++	+
INRA 199	T	+	+	+	+	+	++	+
	I	+	+	+	+	+	+++	++

+ Faible, ++ modérée. +++ intense.



**Figure. 35.** Localisation *in situ* des phénols par la réaction nitroso chez les cals témoins et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei*



**Figure. 36.** Localisation *in situ* des phénols par la réaction nitroso chez les cals témoins et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei*

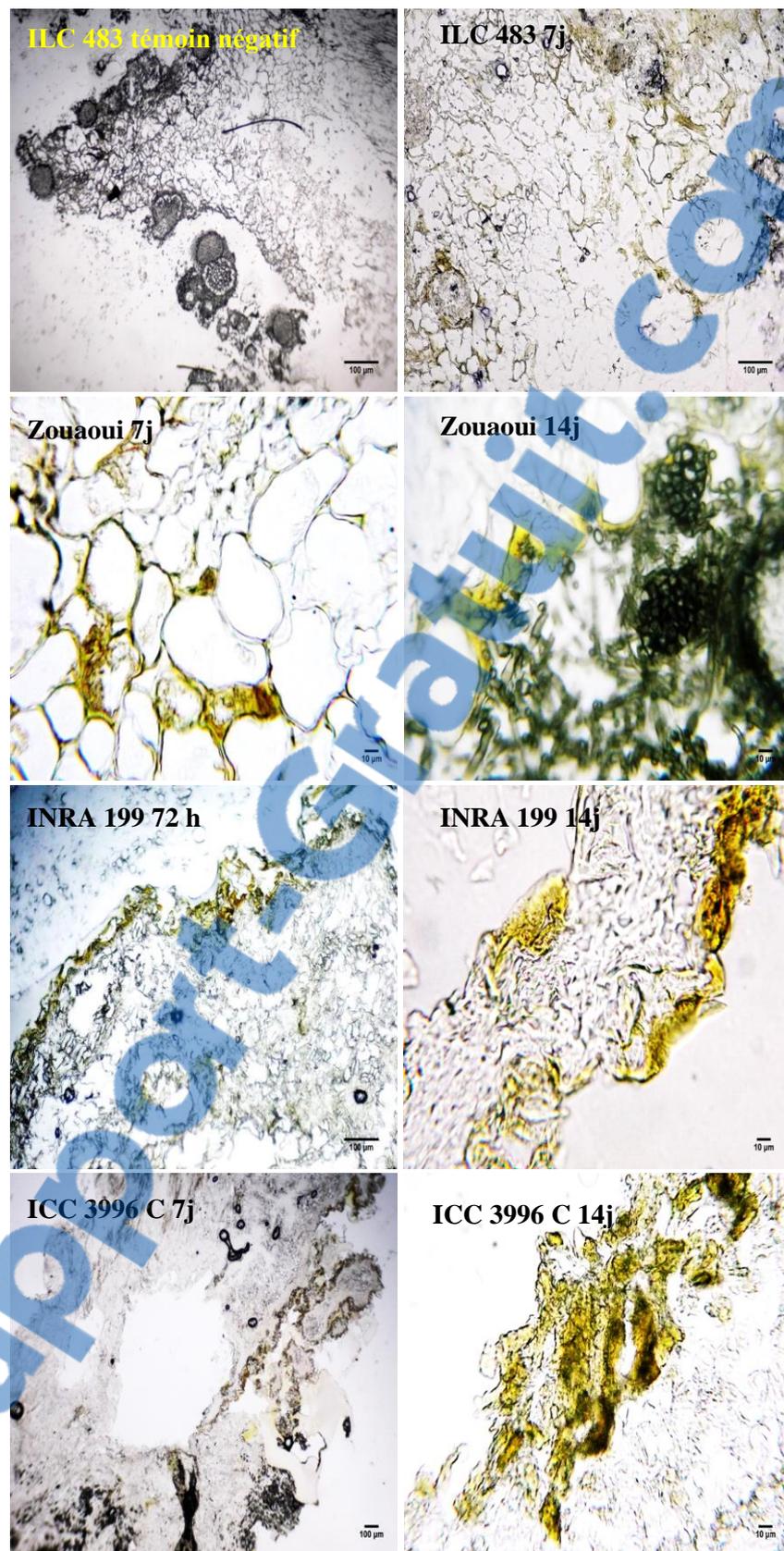
### 3.6. Localisation histochimique des flavonoïdes

Les coupes histologiques des cals témoins et inoculés traités avec une solution d'hydroxyde de sodium à 10%, révèlent la présence de flavonoïdes qui prennent une couleur jaune foncé (Fig.37). L'intensité de la coloration varie chez les cals témoins et inoculés des différents génotypes testés. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 13

**Tableau 13.** Intensité des flavonoïdes produits chez les cals inoculés et témoins

Temps Type de cal		0	12	24	48	72	7j	14j
		Zouaoui	T	+	+	+	+	+
	I	+	+	+	+	+	+	+
ILC 483	T	+	+	+	+	+	+	+
	I	+	+	+	+	+	+	+
Flip 82 150 C	T	+	+	+	+	+	+	+
	I	+	+	+	+	+	++	+
ICC 3996 C	T	+	+	+	+	+	+	+
	I	+	+	+	+	+	++	+
ILC 200	T	+	+	+	+	+	++	+
	I	+	+	+	+	+	++	+
INRA 199	T	+	+	+	+	+	+	+
	I	+	+	+	+	+	++	+

+ Faible, ++ modérée



**Figure. 37.** Localisation *in situ* des flavonoïdes chez les cals témoins et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei*

### 3.7. Études des modifications biochimiques

Le métabolisme des cals inoculés et témoin des différents génotypes présentent des variations dans le taux des métabolites primaires et secondaires analysés. L'étude des résultats statistiques du test de l'analyse de variance multivariée (MANOVA) montre que le test de la trace de Pillai est hautement significatif ( $p < 0.001$ ) pour les trois variables indépendantes appliquées à savoir le génotype testé, le traitement et le temps d'interaction (Tab.14). Ceci suggère que cette fluctuation est sous l'effet principal de ces trois facteurs et de leur effet interactif.

**Tableau 14.** Analyse de variance multivariée (MANOVA) de l'effet du génotype traitement et temps d'interaction

Effet	Trace de Pillai	F	ddl	Erreurddl	Significativité
Génotype (G)	2,506	40,252	20	480,000	0,000**
Temps (T)	1,802	24,586	16	480,000	0,000**
Traitement (Tr)	0,588	41,737	4	117,000	0,000**
G* T* Tr	2,302	8,135	80	480,000	0,000**

*\*\*hautement significatif  $p < 0,01$ ,  $\alpha < 0,05$*

Pour déterminer les effets individuels de chacune des variables indépendantes à savoir le génotype, l'inoculation et le temps d'interaction sur le taux des métabolites analysés, une analyse de variance à un facteur ANOVA est conduite. Elle révèle que le génotype (G), l'inoculation (Tr) et le temps d'interaction (T) ainsi que leur effet interactif (GxTxTr) influencent significativement ( $p < 0,001$ ) l'accumulation des sucres solubles, protéines totales, polyphénols et flavonoïdes (Tab.15).

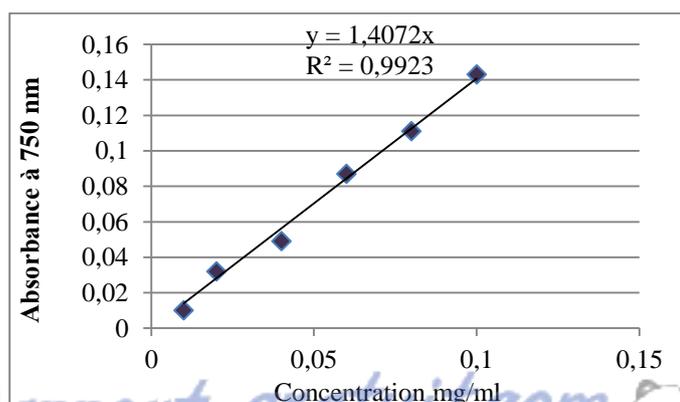
**Tableau.15.** Analyse de variance des concentrations des sucres solubles, protéines totales, polyphénols et flavonoïdes chez les cals de différents génotypes de pois chiche inoculés avec *Ascochyta rabiei*

Effet	Variable dépendante	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Significativité
Génotype (G)	Sucres	6,543	5	1,309	310,237	0,000**
	Protéines	3,359	5	0,672	26,523	0,000**
	Polyphenols	0,156	5	0,031	301,599	0,000**
	Flavonoïdes	0,005	5	0,001	25,507	0,000**
Temps (T)	Sucres	0,546	4	0,136	32,345	0,000**
	Protéines	1,533	4	0,383	15,133	0,000**
	Polyphenols	0,033	4	0,008	80,934	0,000**
	Flavonoïdes	0,005	4	0,001	33,811	0,000**
Traitement (Tr)	Sucres	0,384	1	0,384	91,065	0,000**
	Protéines	0,323	1	0,323	12,753	0,001**
	Polyphenols	0,005	1	0,005	48,353	0,000**
	Flavonoïdes	0,000	1	0,000	5,781	0,018*
G *T*Tr	Sucres	1,065	20	0,053	12,630	0,000**
	Protéines	1,845	20	0,092	3,642	0,000**
	Polyphenols	0,023	20	0,001	11,257	0,000**
	Flavonoïdes	0,012	20	0,001	15,154	0,000**

\*\* hautement significatif ( $p < 0,01$ ), \* significatif ( $p < 0,05$ ) à  $\alpha < 0,05$ .

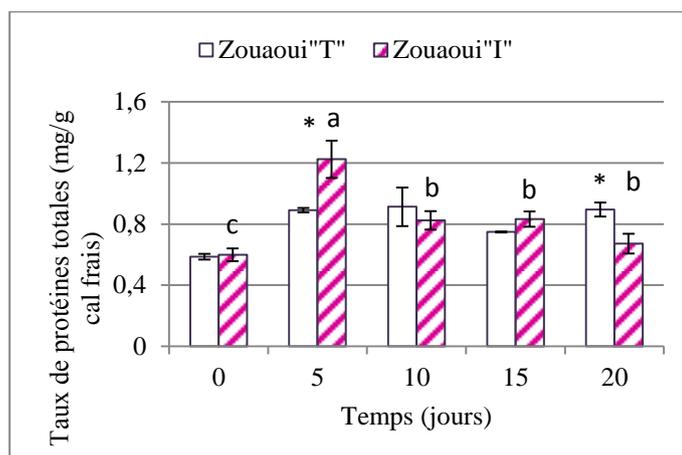
### 3.7.1.Évolution des protéines totales

La teneur en protéines totales obtenue à partir d'extraits bruts méthanoliques est estimée grâce à une courbe d'étalonnage, réalisée avec un composé de référence, l'albumine du sérum bovin à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en mg/g de cal frais. La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,9923$  (Fig.38).



**Figure 38.** Courbe de régression de la gamme étalon d'albumine du sérum bovin (BSA)

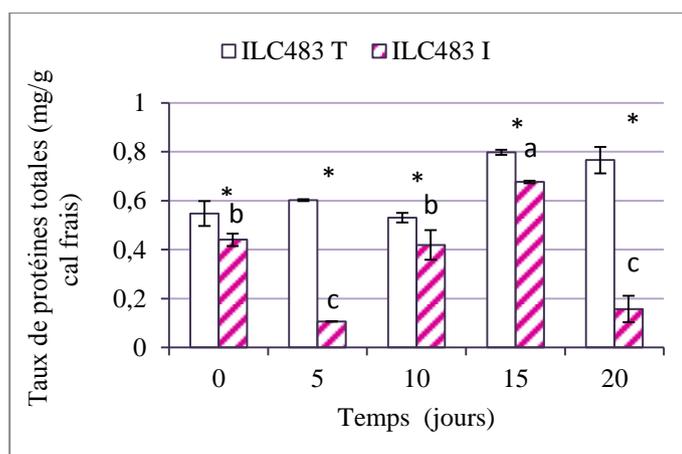
Chez le génotype Zouaoui (Fig.39), le taux de protéines totales enregistré au cinquième jour est significativement supérieur chez les cals inoculés ( $1,22 \pm 0,12$  mg/g cal frais) comparé au témoin ( $0,89 \pm 0,01$  mg/g cal frais). Ultérieurement, il diminue graduellement et atteint au vingtième jour  $0,67 \pm 0,06$  mg/g cal frais, taux significativement inférieur comparé aux témoins.



\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif, les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 39.** Évolution du taux de protéines totales chez les cals témoin (T) et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* (I) du génotype Zouaoui.

Chez le génotype ILC 483, il est remarqué également que le taux de protéines accumulé au vingtième jour est significativement inférieur chez l'inoculé particulièrement au cinquième jour ( $0,106 \pm 0,001$  mg/g cal frais) et au vingtième jour ( $0,157 \pm 0,05$  mg/g cal frais) comparé au témoin (Fig. 40).

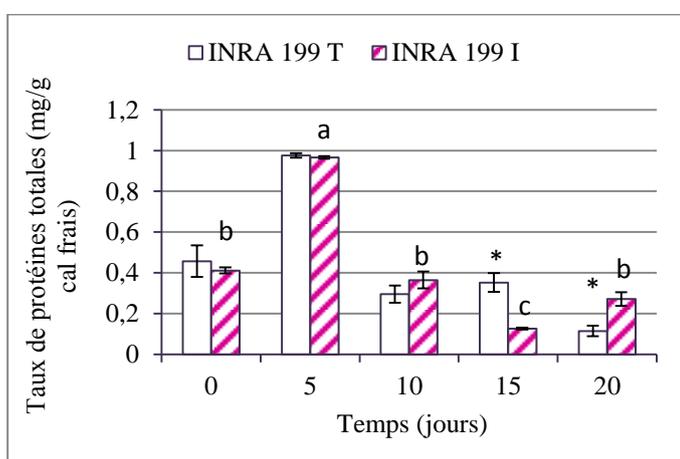


\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif, les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 40.** Évolution du taux de protéines totales chez les cals témoin (T) et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* (I) du génotype ILC 483.

Par ailleurs, il est remarqué que l'inoculation induit une nette diminution dans le taux de protéines durant la phase initiale, puis augmente du triple entre le cinquième et le dixième jour, atteint une valeur maximale ( $0,676 \pm 0,005$  mg/g cal frais) au quinzième jour et diminue drastiquement de 77% au vingtième jour.

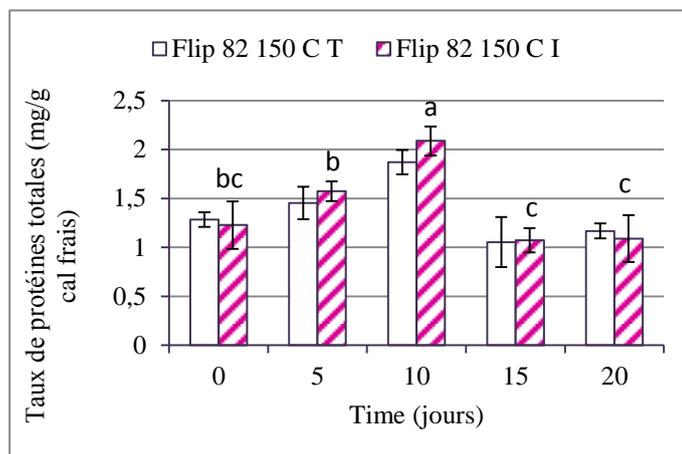
Dans le cas du génotype INRA 199 (fig. 41) une évolution statistiquement égale est observée chez les deux types de cals jusqu'au dixième jour. Le taux maximal est enregistré au cinquième jour, chez l'inoculé ( $0,966 \pm 0,006$  mg/ g cal frais) et le témoin ( $0,976 \pm 0,011$  mg/ g cal frais). Au quinzième jour, le taux de protéines totales diminue chez l'inoculé puis double et enregistre au vingtième jour une valeur significativement supérieure ( $0,271 \pm 0,03$  mg/ g cal frais) comparé au témoin ( $0,114 \pm 0,025$  mg/ g cal frais).



\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif, les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 41.** Évolution du taux de protéines totales chez les cals témoin (T) et inoculés avec les spores *Ascochyta rabiei* (I) du génotype INRA 199

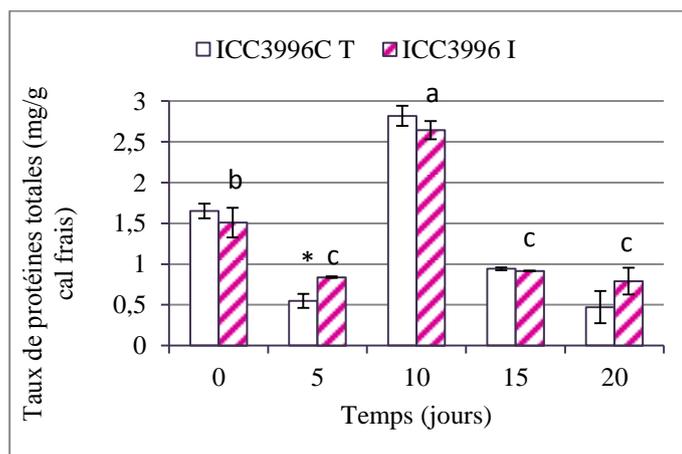
Chez les cals du génotype Flip 82 150 C (Fig.42), le taux de protéines totales augmente graduellement chez les deux types de cals et diminue au-delà du dixième jour. Aucune différence significative n'est observée chez les cals inoculés comparés à leurs témoins respectifs. Une valeur maximale est obtenue au dixième jour chez les inoculés ( $2,088 \pm 0,148$  mg/g cal frais) et témoins ( $1,871 \pm 0,124$  mg/g cal frais).



\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif, les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 42.** Évolution du taux de protéines totales chez les cals témoin (T) et inoculés avec les spores *d'Ascochyta rabiei* (I) du génotype Flip 82 150 C.

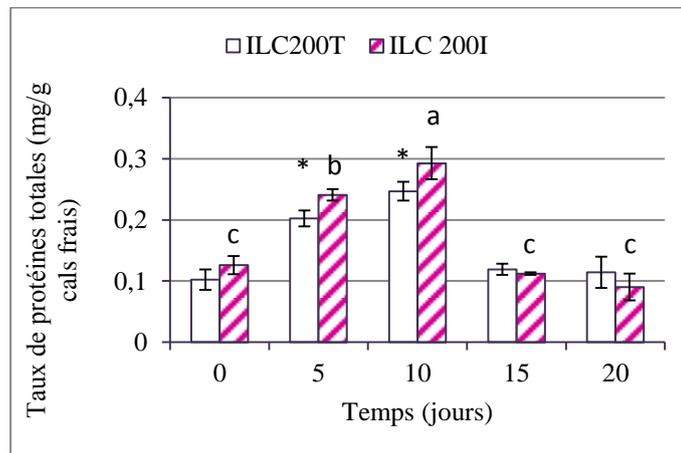
Pour ICC 3996 C (Fig. 43), le taux de protéines totales est statistiquement égal chez les cals inoculés et leurs témoins respectifs excepté au cinquième jour où une augmentation significative est notée chez l'inoculé ( $2,642 \pm 0,111$  mg/g cal frais) par rapport au témoin ( $2,817 \pm 0,123$  mg/g cal frais).



\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif, les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 43.** Évolution du taux de protéines totales chez les cals témoin (T) et inoculés avec les spores *d'Ascochyta rabiei* (I) du génotype ICC 3996 C.

Pour ILC 200 (Fig. 44), le taux de protéines totales augmente graduellement chez les deux types de cals et atteint des valeurs maximales au dixième jour puis régresse pour retrouver le taux initial. Toutefois, il est noté que l'inoculé révèle un taux significativement supérieur ( $0,241 \pm 0,009$  mg / g de cal frais) au cinquième jour comparé au témoin ( $0,202 \pm 0,013$  mg / g de cal frais) et également au dixième jour avec respectivement  $0,293 \pm 0,026$  mg / g de cal frais (inoculé) /  $0,247 \pm 0,15$  mg / g de cal frais (inoculé).



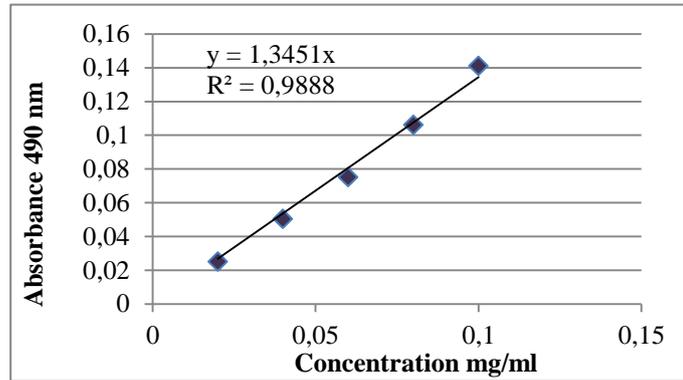
\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif, les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 44.** Évolution du taux de protéines totales chez les cals témoin (T) et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* (I) du génotype ILC 200.

Le suivi de de l'accumulation des protéines totales montre que chez les génotypes ILC 200, INRA 199 et ICC 3996 C, résistants à *Ascochyta rabiei*, le taux augmente significativement sous l'effet de l'inoculation. Chez le génotype tolérant Flip 82 150 C, aucune différence significative n'est observée entre les cals inoculés et témoins. Concernant le génotype ILC 483 identifié comme sensible, généralement le taux de protéines totales est inférieur chez l'inoculé comparé au témoin. Pour le génotype Zouaoui, il est remarqué que le taux de protéines enregistre une augmentation chez l'inoculé au cinquième mais diminue significativement au vingtième jour comparé au témoin.

### 3.7.2 Évolution des sucres solubles totaux

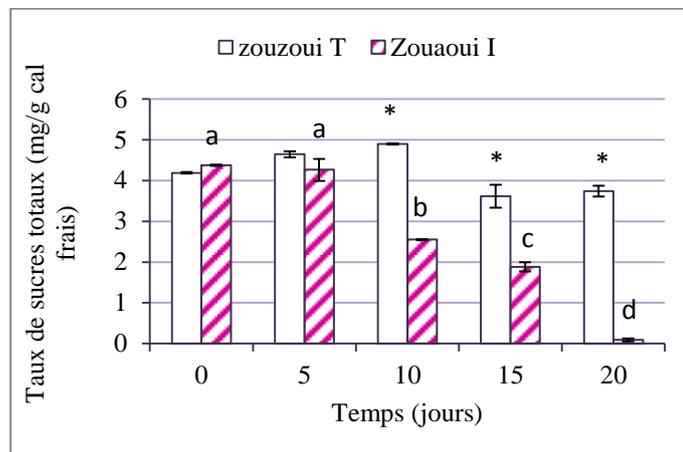
La teneur en sucres solubles totaux des d'extraits bruts méthanoliques est estimée grâce à une courbe d'étalonnage, réalisée avec une solution de glucose différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en mg/g de cal frais. La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,9888$  (Fig. 45).



**Figure 45.** Courbe de régression de la gamme étalon du glucose

Les résultats obtenus du taux de sucres solubles obtenus chez les cals inoculés et témoin révèlent des variabilités chez les différents génotypes.

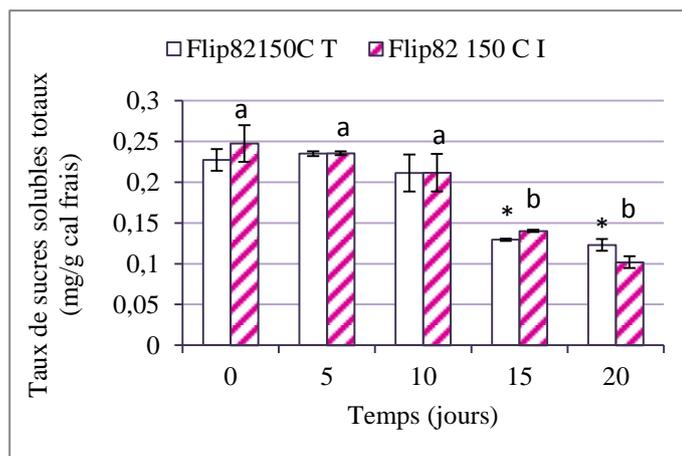
Le suivi de l'évolution du taux de sucres solubles totaux accumulés chez le génotype Zouaoui est significativement inférieur chez l'inoculé comparé au témoin au dixième jour, quinzième et vingtième jour. Après un taux statistiquement similaire durant les cinq premiers jours, il diminue significativement de 40% chez l'inoculé et passe de  $4,26 \pm 0,027$  mg/g cals frais à  $2,548 \pm 0,010$  mg/g cals frais au dixième jour, puis de 28 % au quinzième jour et de 95% au vingtième jour (Fig.46).



\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif, les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 46.** Évolution du taux de sucres solubles totaux chez les cals témoin (T) et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* (I) du génotype Zouaoui.

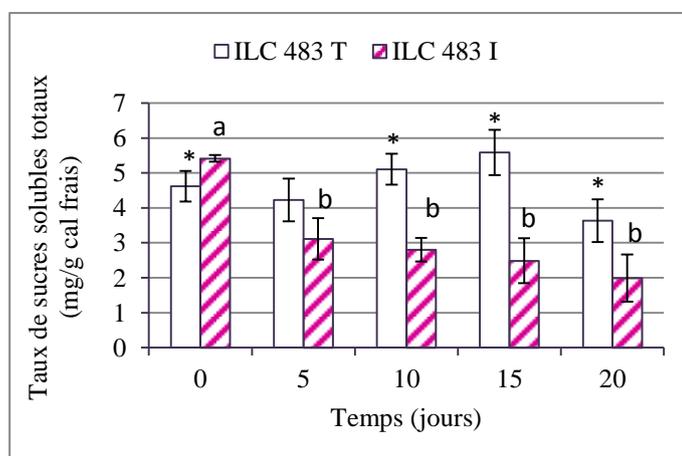
Chez le génotype Flip 82 150 C (Fig.47), l'évolution du taux de sucres solubles totaux accumulés chez les cals inoculés et témoin présente des profils similaires durant les quinze premiers jours. Au vingtième jour, le taux accumulé chez l'inoculé diminue de 28% et atteint 0,102 mg/g cals frais, valeur significativement inférieure au témoin respectif (0,123 mg/g cal frais).



\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif, les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 47.** Évolution du taux de sucres solubles totaux chez les cals témoin (T) et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* (I) du génotype Flip 82 150C.

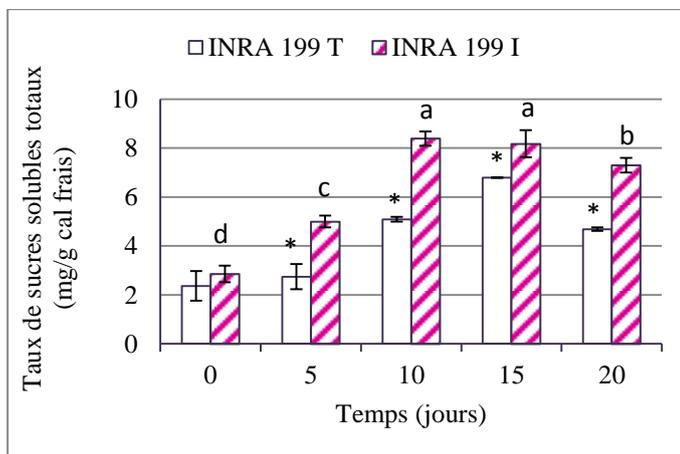
Dans le cas du génotype ILC 483 (Fig.48), le taux de sucres solubles totaux diminue significativement sous l'effet de l'inoculation. A partir du dixième jour, le taux enregistré chez les cals témoins est deux fois supérieur à celui enregistré chez les cals témoins.



\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif, les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 48.** Évolution du taux de sucres solubles totaux chez les cals témoin (T) et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* (I) du génotype ILC 483.

Chez INRA 199 (Fig.49), le taux de sucres solubles accumulés augmente chez le témoin et l'inoculé. Toutefois, cette croissance est plus accélérée chez l'inoculé et les taux accumulés sont significativement plus élevés au cinquième jour ( $0,286 \pm 0,0340$  mg/g cal frais), dixième jour ( $0,500 \pm 0,024$  mg/g cals frais), quinzième jour ( $0,840 \pm 0,029$  mg/g cal frais) et vingtième jour comparé au témoin qui enregistre respectivement  $0,274 \pm 0,061$  mg/g cal frais,  $0,509 \pm 0,01$  mg/g cals frais,  $0,680 \pm 0,011$  mg/g cals frais et  $0,469 \pm 0,070$  mg/g cals frais.

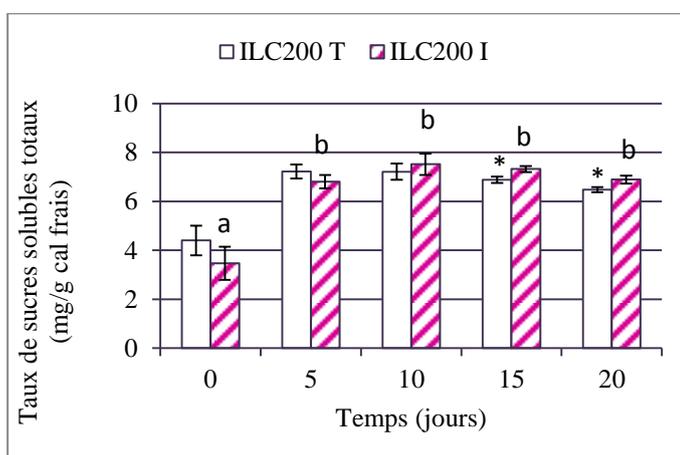


\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif  $p < 0,05$

Les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 49.** Évolution du taux de sucres solubles totaux chez les cals témoin (T) et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* (I) du génotype INRA 199.

Dans le cas du génotype ILC 200 (Fig.50), après une phase où le taux de sucres solubles totaux est statistiquement similaire chez les deux types de cals, une augmentation significative est observée chez les cals inoculés au quinzième jour ( $7,325 \pm 0,122$  mg/ g cal frais) et au vingtième jour ( $6,894 \pm 0,160$  mg/ g cal frais) comparé au témoin ( $6,883 \pm 0,134$  mg/g cal frais et  $6,483 \pm 0,103$  mg/ g cal frais respectivement)

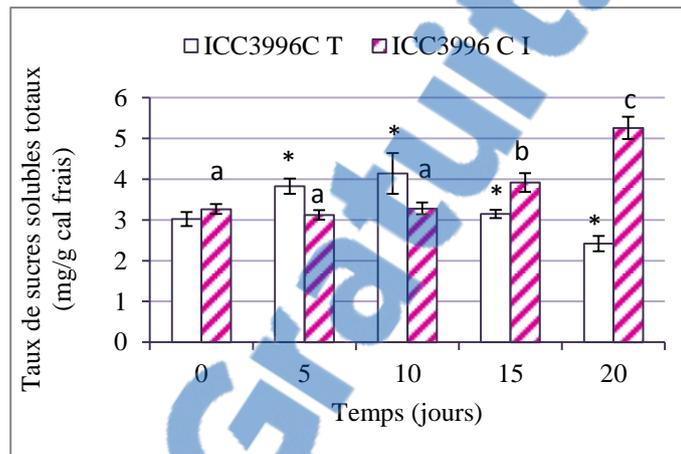


\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif  $p < 0,05$

Les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 50.** Évolution du taux de sucres solubles totaux chez les cals témoins (T) et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* (I) du génotype ILC 200.

Chez le génotype ICC3996 C (Fig.51), après un taux initial statistiquement similaire, le taux de sucres solubles totaux accumulés est significativement supérieur chez le témoin ( $0,383 \pm 0,019$  mg/g cals frais) comparé au témoin  $0,383 \pm 0,019$  mg/g cals frais) comparé à l'inoculé ( $0,312 \pm 0,012$  mg/g cals frais) au cinquième jour ainsi qu'au dixième jour avec respectivement  $0,414 \pm 0,050$  mg/g cals frais et  $0,328 \pm 0,015$  mg/g cals frais. il augmente ensuite significativement chez l'inoculé par rapport au témoin et des valeurs significativement supérieures sont enregistrées au quinzième jour et au vingtième jour chez l'inoculé qui accumule respectivement  $0,392 \pm 0,023$  mg/g cals frais et  $0,526 \pm 0,028$  mg/g cals frais comparé au témoin.



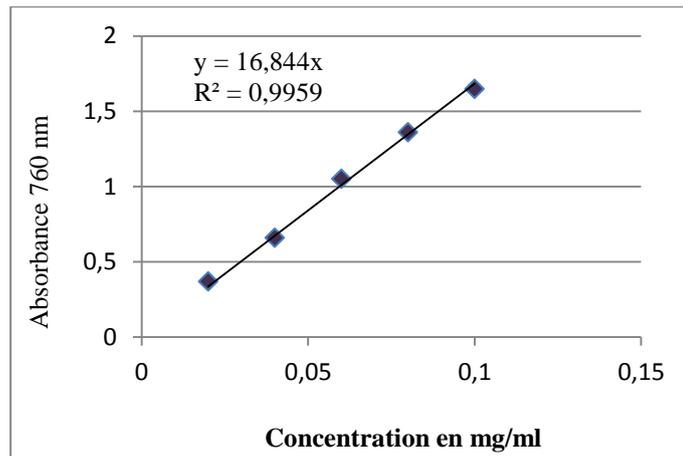
\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif  $p < 0,05$   
 Les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 51.** Évolution du taux de sucres solubles totaux chez les cals témoins (T) et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* (I) du génotype ICC 3996C.

Les résultats obtenus chez les différents génotypes montrent que l'accumulation des sucres solubles totaux diminue chez les cals inoculés comparé aux témoins pour ILC 483 caractérisé comme sensible à *Ascochyta rabiei* et également pour le génotype Zouaoui. Dans le cas des génotypes définis comme résistants, INRA 199, ILC 200, ICC 3996 C, le taux de sucres solubles chez les cals inoculés est supérieur comparé aux témoins.

### 3.7.3. Évolution des composés phénoliques

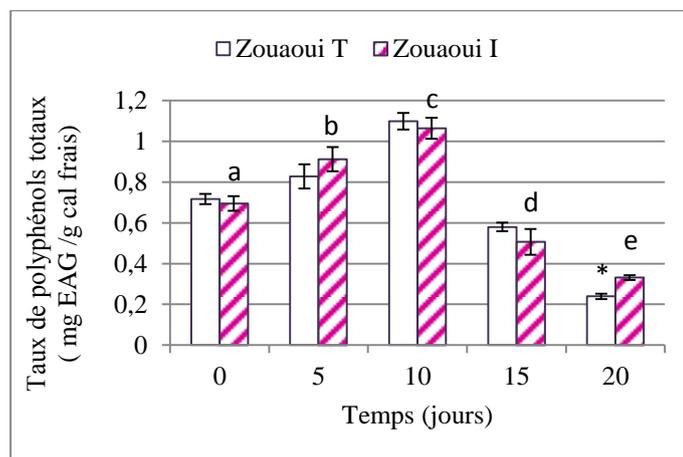
La teneur en composés phénoliques des extraits de cals témoins et inoculés est estimée grâce à une courbe d'étalonnage, une solution d'acide gallique à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en mg équivalent en acide gallique par g de cal frais (mg EAG/ml d'extrait). La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,9959$  (Fig. 52).



**Figure 52.** Courbe de régression de la gamme étalon des polyphénols d'acide gallique

Les résultats obtenus montrent que le taux de composés phénoliques varie chez les cals des différents génotypes de pois chiche inoculés ou non avec les spores *d'Ascochyta rabiei*.

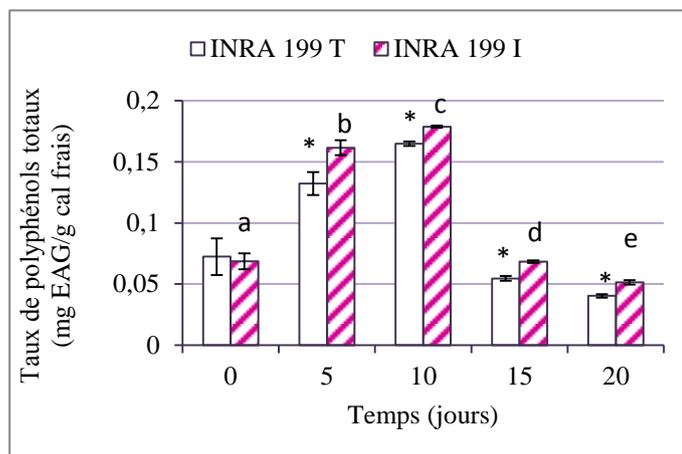
Pour le génotype Zouaoui (Fig. 53), l'évolution temporelle de ces métabolites montrent des taux statistiquement similaires chez les cals inoculés et témoins jusqu'au quinzième jour puisqu'aucune différence significative n'est observée. Au vingtième jour, le taux de phénols est significativement supérieur chez les inoculés ( $0,332 \pm 0,012$  mg EAG /g cal frais) comparé au témoin ( $0,239 \pm 0,014$  mg EAG /g cal frais).



\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif  $p < 0,05$   
 Les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 53.** Évolution du taux des polyphénols totaux chez les cals témoins (T) et inoculés avec les spores *d'Ascochyta rabiei* (I) du génotype Zouaoui.

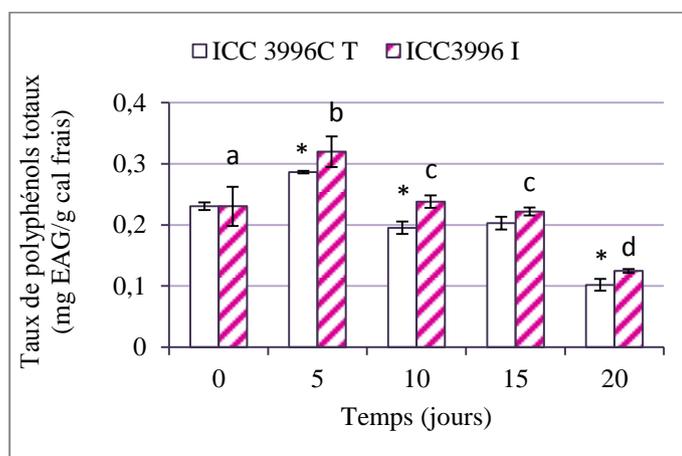
Dans le cas du génotype INRA 199 (Fig.54),une différence significative est observée dans le taux de composés phénoliques accumulés à partir du cinquième jour. Les cals inoculés révèlent un taux significativement supérieur au cinquième jour ( $0,165 \pm 0,006$ mg EAG/ g cals frais) au dixième jour ( $0,179 \pm 0,001$ mg EAG/ g cals frais), au quinzième jour ( $0,068 \pm 0,001$ mg EAG/ g cals frais) et au vingtième jour ( $0,051 \pm 0,002$  mg EAG/ g cals frais) comparés à leurs témoins respectifs.



\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif  $p < 0,05$   
 Les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 54.** Évolution du taux des polyphénols totaux chez les cals témoins (T) et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* (I) du génotype INRA 199.

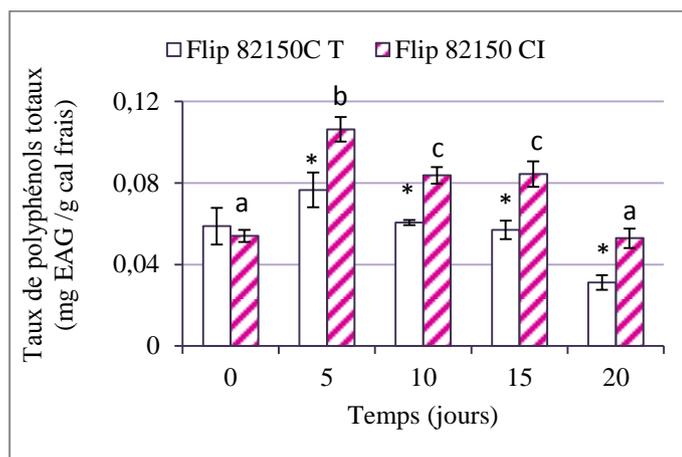
Dans le cas du génotype ICC 3996C (Fig. 55), une augmentation est également observée chez l'inoculé comparé au témoin au cinquième jour, dixième jour, quinzième jour et vingtième jour.



\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif  $p < 0,05$   
 Les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 55.** Évolution du taux des polyphénols totaux chez les cals témoins (T) et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* (I) du génotype ICC 3996 C.

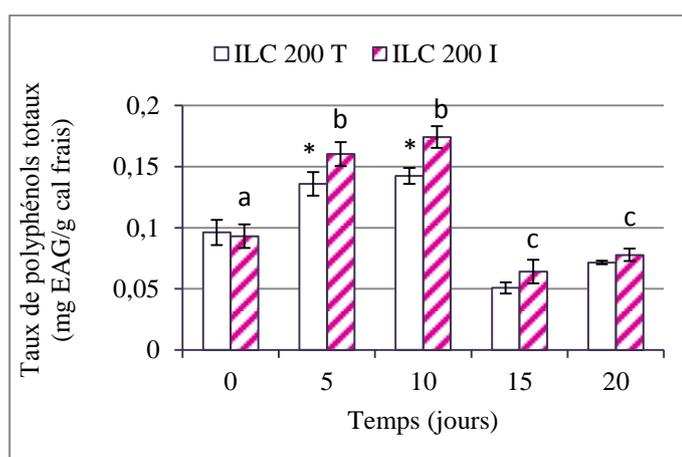
Le même profil est observé chez le génotype Flip 82 150C (Fig. 56). A partir du cinquième jour, le taux des composés phénoliques est significativement supérieur chez les cals inoculés comparé aux témoins. Ceci est particulièrement observé au vingtième jour où le taux accumulé est 1.7 fois plus élevé.



\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif  $p < 0,05$   
 Les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 56.** Évolution du taux des polyphénols totaux chez les cals témoins (T) et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* (I) du génotype Flip 82 150 C.

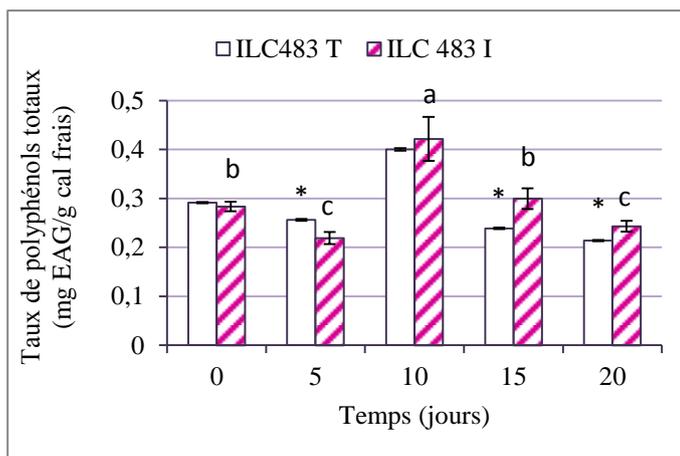
L'évolution de l'accumulation des composés phénoliques chez les cals du génotype ILC 200 révèle au cinquième jour un taux significativement supérieur chez l'inoculé ( $0,1602 \pm 0,0098$  mg EAG/g cals frais) comparé au témoin ( $0,1359 \pm 0,0096$  mg EAG/g cals frais) et également au dixième jour avec respectivement  $0,1741 \pm 0,0088$  mg EAG/g cals frais et  $0,1424 \pm 0,0065$  mg EAG/g cals frais (Fig. 57).



\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif  $p < 0,05$   
 Les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 57.** Évolution du taux des polyphénols totaux chez les cals témoins (T) et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* (I) du génotype ILC 200.

Chez le génotype ILC 483 (fig. 58), le suivi de l'évolution du taux de composés phénoliques ne révèle pas de différence significative entre les deux types de cals excepté au quinzième jour où  $0,299 \pm 0,021$  mg EAG/g cals frais sont enregistrés pour l'inoculé et  $0,238 \pm 0,001$  mg EAG/g cals frais chez le témoin.



\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif  $p < 0,05$

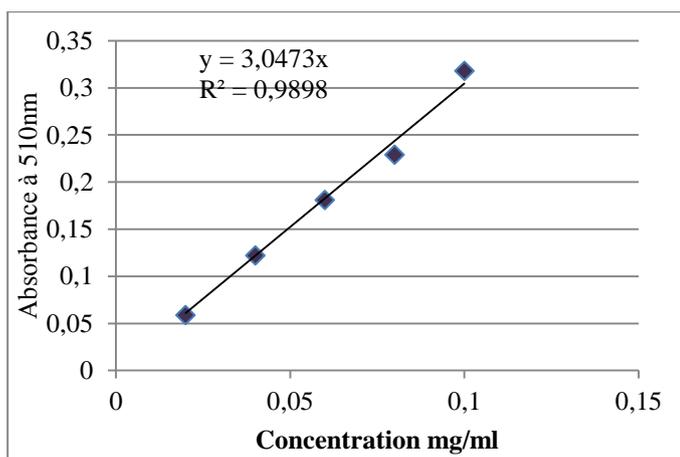
Les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 58.** Évolution du taux des polyphénols totaux chez les cals témoins (T) et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* (I) du génotype ILC 483

Les différents résultats révèlent que le taux de composés phénoliques augmente sous l'effet de l'inoculation. Cette croissance est observée à partir du cinquième jour chez les génotypes caractérisés comme résistants, INRA 199, ICC 3996C, ILC 200 ou tolérant comme Flip 82 150C. Chez le génotype ILC 483 identifié comme sensible, l'augmentation dans le taux de ces composés est observée plus tardivement, au quinzième jour et pour le génotype Zouaoui, au vingtième jour.

### 3.7.4. Évolution des flavonoïdes

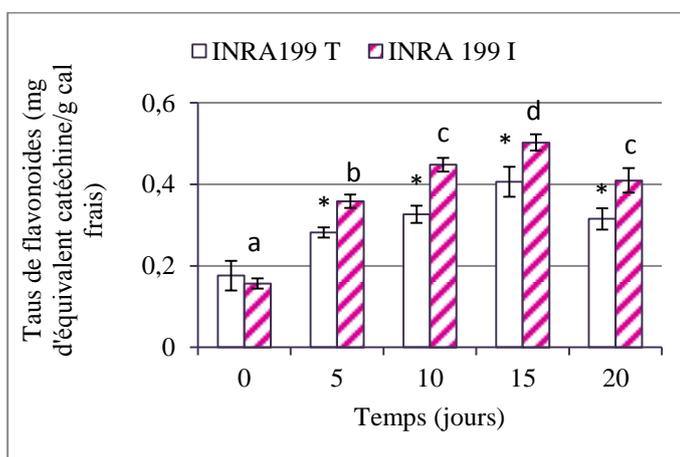
La teneur en composés phénoliques des extraits de cals témoins et inoculés est estimée grâce à une courbe d'étalonnage, une solution de catéchine à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de catéchine par g de cal frais (mg Ecat/ml d'extrait). La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,9898$  (Fig. 59).



**Figure 59.** Courbe de régression de la gamme étalon des flavonoïdes de la catéchine

Le suivi temporel du taux des flavonoïdes chez les cals inoculés et témoins des différents génotypes testés révèlent des taux variables.

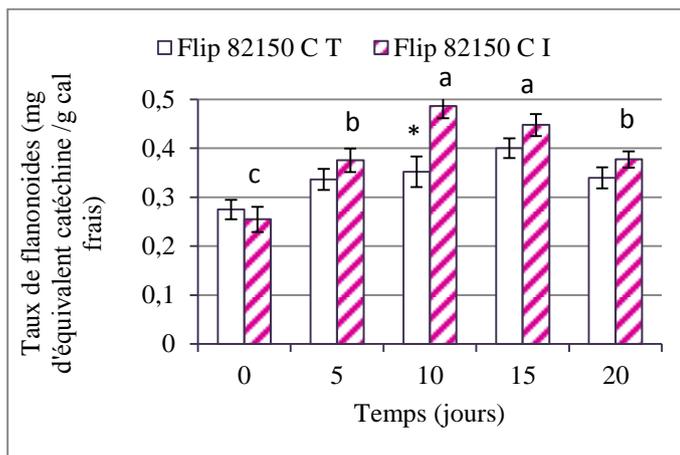
Le génotype INRA 199 (Fig. 60) présente une accumulation significativement supérieure chez les cals inoculés comparés aux témoins. Ainsi,  $0,358 \pm 0,016$  mg Ecat/ cal frais sont accumulés au cinquième jour chez les cals inoculés,  $0,448 \pm 0,016$  mg Ecat/ cal frais au dixième jour,  $0,502 \pm 0,021$  mg Ecat/ cal frais au quinzième jour,  $0,409$  mg Ecat/ cal frais  $0,029$  mg Ecat/ cal frais au vingtième jour et chez leurs témoins respectifs  $0,218 \pm 0,012$  mg Ecat/ cal frais,  $0,326 \pm 0,021$  mg Ecat/ cal frais,  $0,406 \pm 0,036$  mg Ecat/ cal frais  $0,3152 \pm 0,026$  mg Ecat/ cal frais.



\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif  $p < 0,05$   
 Les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 60.** Évolution du taux des flavonoïdes chez les cals témoin (T) et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* (I) du génotype INRA 199.

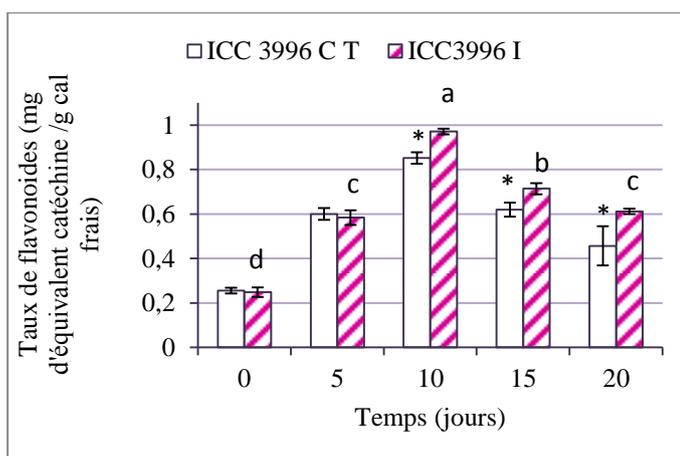
Dans le cas du génotype Flip 82 150 C (Fig. 61), l'évolution de la teneur en flavonoïdes est généralement statistiquement similaire chez les deux types de cals. Seule, une augmentation significative est enregistrée au dixième jour, chez les cals inoculés ( $0,486 \pm 0,02$  mg Ecat/ cal frais ) comparé à leurs témoins respectifs ( $0,352 \pm 0,031$  mg Ecat/ cal frais).



\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif  $p < 0,05$   
 Les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 61.** Évolution du taux des flavonoïdes chez les cals témoin (T) et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* (I) du génotype Flip 82 150 C.

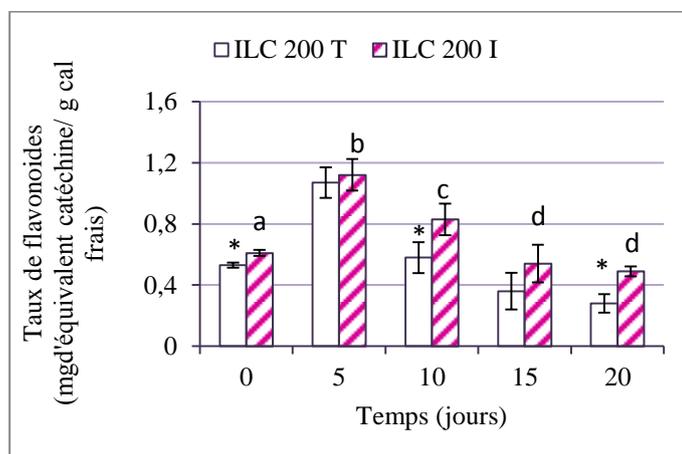
Pour le génotype ICC 3996 C, les cals inoculés présentent un taux significativement supérieur chez les cals inoculés au dixième jour ( $0,970 \pm 0,012$  mg Ecat/ cal frais ), quinzième jour ( $0,714 \pm 0,02$  mg Ecat/ cal frais ) et au vingtième jour ( $0,611 \pm 0,012$  mg Ecat/ cal frais ) comparé au témoins respectifs ( $0,486 \pm 0,02$  mg Ecat/ cal frais,  $0,447 \pm 0,02$  mg Ecat/ cal frais et  $0,377 \pm 0,01$  mg Ecat/ cal frais) (Fig. 62).



\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif  $p < 0,05$   
 Les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 62.** Évolution du taux des flavonoïdes chez les cals témoin (T) et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* (I) du génotype ICC 3996 C.

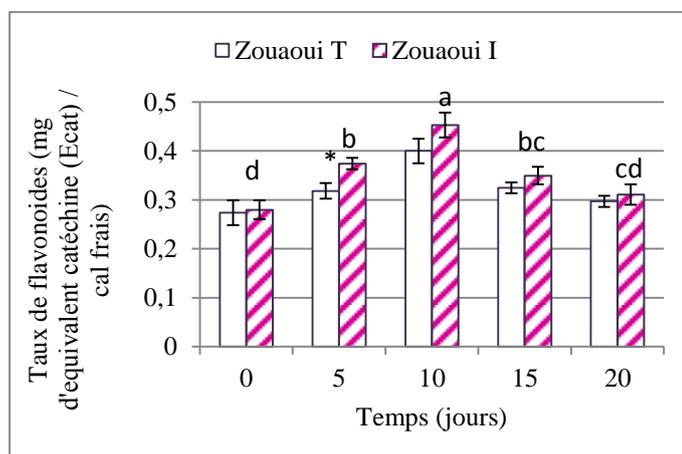
L'évolution du taux de flavonoïdes accumulé chez les deux types de cals du génotype ILC 200 suit une courbe hyperbole, avec un taux maximal statistiquement similaire atteint au cinquième jour. Néanmoins, la teneur est significativement supérieure chez les cals inoculés au dixième jour ( $0,831 \pm 0,102$  mg Ecat/ cal frais) et au vingtième jour ( $0,491 \pm 0,031$  mg Ecat/ cal frais) comparé à leurs témoins respectifs (Fig. 63).



\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif  $p < 0,05$   
 Les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 63.** Évolution du taux des flavonoïdes chez les cals témoin (T) et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* (I) du génotype ILC 200.

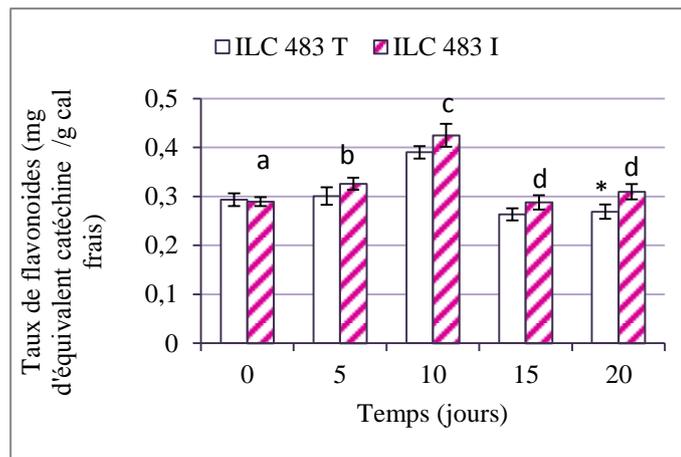
Pour le génotype Zouaoui, aucune différence significative n'est observée entre le taux de flavonoïdes accumulé chez les deux types de cals, à l'exception du cinquième jour où une teneur significativement supérieure est observée chez les cals inoculés ( $0,453 \pm 0,023$  mg (Ecat)/ g cal frais) comparé aux témoins ( $0,400 \pm 0,025$  mg (Ecat)/ g cal frais) (Fig. 64).



\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif  $p < 0,05$   
 Les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 64.** Évolution du taux des flavonoïdes chez les cals témoin (T) et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* (I) du génotype Zouaoui.

Pour le génotype ILC483 le même profil est observé. Les taux de flavonoïdes sont statistiquement similaires à l'exception du vingtième jour, où une valeur significativement supérieure est obtenue chez l'inoculé ( $0,491 \pm 0,031$  mg Ecat /g cal frais comparé au témoin (Fig. 65).



\* indique une différence significative entre l'inoculé et son témoin respectif  $p < 0,05$   
 Les lettres identifient les groupes homogènes des cals inoculés selon le test de Duncan à  $p < 0,05$

**Figure 65.** Évolution du taux des flavonoïdes chez les cals témoin (T) et inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei* (I) du génotype ILC 483.

L'accumulation des flavonoïdes chez les cals issus des différents génotypes testés présentent une évolution divergente. Chez les génotypes INRA 199, ILC 200, ICC 3996 C (résistants) et Flip 82 150 C (tolérant) le taux est généralement plus élevé chez les cals inoculés comparés aux témoins. Cette augmentation est enregistrée dès le cinquième jour pour INRA 199 et plus tardivement, au dixième pour les autres génotypes.

Chez ILC 483 (sensible) et Zouaoui le taux de flavonoïdes est généralement statistiquement similaire à l'exception du vingtième jour.

### 3.7.5. Corrélation entre les métabolites primaires et secondaires

Le test de Pearson (Tab.16) révèle une corrélation positive significative ( $r=0,175$ ,  $p<0,05$ ) entre le taux de sucres et des protéines et hautement significative avec le taux de polyphénols ( $r=0,290$ ,  $p<0,01$ ), Une corrélation positive hautement significative est également observée entre les taux des protéines et des polyphénols accumulés ( $r=0,312$ ,  $p<0,01$ ).

**Tableau 16.**Matrice de corrélation de Pearson entre les différents facteurs

	Sucres	Protéines	Polyphénols	Flavonoïdes
Sucres	1			
Protéines	0,175*	1		
Polyphenols	0,290**	0,312**	1	
Flavonoïdes	0,119	-0,148*	0,115	1

\*\* . La corrélation est significative au niveau 0,01, \* significative au niveau 0,05.

### 3.8. Analyse qualitative des composés phénoliques des extraits de cals

L'analyse qualitative après chromatographie sur couche mince CCM des différents extraits, révèle une séparation variable selon les solvants testés. Le système éthanol : eau distillée : acide formique permet d'obtenir une migration et une séparation appréciables des spots. Il permet d'obtenir des chromatogrammes homogènes.

Le but de cette étape du travail est de caractériser les principaux composés phénoliques qui peuvent être liés à l'inoculation des cals des différents génotypes.

La visualisation sous UV, a mis en évidence diverses tâches sombres à 254 nm et des fluorescences sous 365 nm (Annexe 4).

Les rapports frontaux et les couleurs des différents spots des cals inoculés et témoins des différents génotypes, observés sous UV avant et après pulvérisation du révélateur sont rapportés dans le tableau

L'analyse des différents chromatogrammes des différents extraits révèle la présence de plusieurs composés. Quelques-uns chez les cals témoins et inoculés et d'autres produits de *novo* suite à l'inoculation.

**Tableau 17.** Rapports frontaux (Rf) et couleurs des composés séparés par chromatographie sur couche mince CCM avec le système ethanol :acide formique :eau(18 :1 :1) des cals témoins et inoculés du génotype ICC 3996 C, observés à 365nm avant et après révélation

Génotype	Traitement	Temps	365nm		365nm/AlCl3	
			Rf	Couleur	Rf	Couleur
ICC 3996 C	T	0	0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent
		5	0,9	Bleu fluorescent	0,9	Bleu fluorescent
		10	0,9	Bleu fluorescent	0,9	Bleu fluorescent
			0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent
		15	0,9	Bleu fluorescent	0,9	Bleu fluorescent
			0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent
		20	0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent
	I	0	0,93	Bleu fluorescent trainee	0,93	Bleu fluorescent
		5	0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent
		10	0	Bleu fluorescent trainée	0	Bleu fluorescent
			0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent
		15	0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent
		20	0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent

**Tableau 18.** Rapports frontaux (Rf) et couleurs des composés séparés par chromatographie sur couche mince CCM avec le système éthanol :acide formique :eau(18 :1 :1) des cals témoins et inoculés du génotype INRA 199, observés à 365nm avant et après révélation

Génotype	Traitement	Temps	365nm		365nm/AlCl3		
			Rf	Couleur	Rf	Couleur	
INRA 199	T	0	0,76	Bleu fluorescent	0,76	Bleu fluorescent	
			0,83	Bleu fluorescent	0,83	Bleu fluorescent	
		5	0,76	Bleu fluorescent	0,76	Bleu fluorescent	
			0,83	Bleu fluorescent	0,83	Bleu fluorescent	
		10	0,76	Bleu fluorescent	0,76	Bleu fluorescent	
			0,83	Bleu fluorescent	0,83	Bleu fluorescent	
		15	0,76	Bleu fluorescent	0,76	Bleu fluorescent	
			0,83	Bleu fluorescent	0,83	Bleu fluorescent	
		20	0,76	Bleu fluorescent	0,76	Bleu fluorescent	
			0,83	Bleu verdâtre fluorescent	0,83	Bleu fluorescent	
		I	0	0,76	Bleu fluorescent trainée	0,76	Bleu fluorescent
				0,83	Bleu fluorescent	0,83	Bleu fluorescent
	5		0,76	Bleu fluorescent	0,76	Bleu fluorescent	
			0,83	Bleu fluorescent	0,83	Bleu fluorescent	
	10		0	Bleu fluorescent	0	Bleu fluorescent	
			0,76	Bleu fluorescent	0,76	Bleu fluorescent	
			0,83	Bleu fluorescent	0,83	Bleu fluorescent	
	15		0,83	Bleu fluorescent	0,83	Bleu fluorescent	
	20	0,83	Bleu fluorescent	0,83	Bleu fluorescent		

**Tableau 19.** Rapports frontaux (Rf) et couleurs des composés séparés par chromatographie sur couche mince CCM avec le système éthanol :acide formique :eau(18 :1 :1) des cals témoins et inoculés du génotype Flip 82 150 , observés à 365nm avant et après révélation

Génotype	Traitement	Temps	365nm		365nm/AlCl3		
			Rf	Couleur	Rf	Couleur	
Flip 82 150 C	T	0	0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent	
		5	0	0	Bleu fluorescent	0	Bleu fluorescent
			0,67	Bleu fluorescent	0,67	Bleu fluorescent	
			0,83	Bleu fluorescent	0,83	Bleu fluorescent	
			0,93	Bleu fluorescent verdâtre	0,93	Bleu fluorescent	
		10	0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent	
		15	0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent	
		20	0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent	
	I	0	0,88	Bleu fluorescent	0,88	Bleu fluorescent	
			0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent	
		5	0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent	
		10	0,93	Bleu fluorescent trainée	0,93	Bleu fluorescent	
		15	0,88	Bleu fluorescent	0,88	Bleu fluorescent	
			0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent	
		20	0,93	Bleu fluorescent trainée	0,93	Bleu fluorescent	

**Tableau 20.** Rapports frontaux (Rf) et couleurs des composés séparés par chromatographie sur couche mince CCM avec le système éthanol : acide formique : eau (18 :1 :1) des cals témoins et inoculés du génotype ILC 200 C, observés à 365nm avant et après révélation

Génotype	Traitement	Temps	365nm		365nm/AlCl3		
			Rf	Couleur	Rf	Couleur	
ILC 200	T	0	0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent	
		5	0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent	
		10	0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent	
		15	0,83	Bleu fluorescent	0,83	Bleu fluorescent	
			0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent	
		20	0,83	Bleu fluorescent	0,83	Bleu fluorescent	
			0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent	
		I	0	0,76	Bleu fluorescent	0,76	Bleu fluorescent
				0,88	Bleu fluorescent	0,88	Bleu fluorescent
				0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent
	5		0,76	Bleu fluorescent	0,76	Bleu fluorescent	
			0,88	Bleu fluorescent	0,88	Bleu fluorescent	
			0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent	
	10		0,93	Bleu fluorescent trainée	0,93	Bleu fluorescent	
	15		0,88	Bleu fluorescent	0,88	Bleu fluorescent	
			0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent	
	20		0	Bleu fluorescent	0	Bleu fluorescent	
			0,88	Bleu fluorescent	0,88	Bleu fluorescent	
			0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent	

**Tableau 21.** Rapports frontaux (Rf) et couleurs des composés séparés par chromatographie sur couche mince CCM avec le système éthanol : acide formique : eau (18 :1 :1) des cals témoins et inoculés du génotype Zouaoui, observés à 365nm avant et après révélation

Génotype	Traitement	Temps	365nm		365nm/AlCl3	
			Rf	Couleur	Rf	Couleur
Zouaoui	T	0	-	-	-	-
		5	0,88	Bleu fluorescent	0,88	Jaune fluorescent
			0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent
		10	0,88	Bleu fluorescent	0,88	Bleu fluorescent
		15	0,88	bleu fluorescent	0,88	Jaune fluorescent
			0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent
	20	0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent	
	I	0	0,93	Bleu fluorescent	0,93	Jaune vert
		5	0,93	Bleu fluorescent trainée	0,93	Bleu fluorescent
		10	0,88	Bleu fluorescent	0,88	Bleu fluorescent
			0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent
		15	0,93	Bleu fluorescent trainée	0,93	Bleu fluorescent
		20	0,93	Bleu fluorescent trainée	0,93	Bleu fluorescent

**Tableau 22.** Rapports frontaux (Rf) et couleurs des composés séparés par chromatographie sur couche mince CCM avec le système éthanol : acide formique : eau (18 :1 :1) des cals témoins et inoculés du génotype ILC483, observés à 365nm avant et après révélation

Génotype	Traitement	Temps	365nm		365nm/AlCl <sub>3</sub>	
			Rf	Couleur	Rf	Couleur
ILC 483	T	0	0	Bleu fluorescent	0	Bleu fluorescent
			0,83	Bleu fluorescent trainée	0,83	Bleu fluorescent
			0,88	Bleu fluorescent	0,88	Bleu fluorescent
		5	0	Bleu fluorescent	0	Bleu fluorescent
			0,88	Bleu fluorescent	0,88	Bleu fluorescent
		10	0	Bleu fluorescent	0	Bleu fluorescent
			0,88	Bleu fluorescent trainée	0,88	Bleu fluorescent
		15	0,88	Bleu fluorescente	0,88	Jaune orangé
		20	0	Bleu fluorescent	0	Bleu fluorescent
			0,69	Jaune verdâtre	0,69	Vert
			0,83	Bleu fluorescent	0,83	Bleu fluorescent
			0,88	Bleu fluorescent	0,88	Bleu fluorescent
	I	0	0,76	Bleu fluorescent	0,76	Bleu fluorescent
			0,93	Bleu fluorescent	0,93	Bleu fluorescent
		5	0	Bleu fluorescent	0	Bleu fluorescent
			0,11	Bleu fluorescent	0,11	Bleu fluorescent
			0,76	Orange	0,76	Jaune fluorescent
			0,88	Bleu fluorescent	0,88	Bleu fluorescent
		10	0	Bleu fluorescent	0	Bleu fluorescent
			0,5	Orange	0,5	Jaune fluorescent
			0,76	Bleu fluorescent	0,76	Bleu fluorescent
			0,88	Bleu fluorescent	0,88	Bleu fluorescent
		15	0,88	Bleu fluorescent	0,88	Bleu fluorescent
		20	0,83	Bleu fluorescent	0,83	Bleu fluorescent
0,88	Bleu fluorescent		0,88	Bleu fluorescent		

Chez le génotype INRA 199, majoritairement deux spots  $R_f = 0,76$  et  $R_f = 0,83$  de fluorescence bleu fluorescente sont observés chez les cals témoins et inoculés. Un spot supplémentaire d'un  $R_f = 0$  de fluorescence bleu fluorescente apparaît au dixième jour chez les cals inoculés (Tab. 18).

Pour le génotype ICC 3996 C, l'analyse des chromatogrammes révèle que dans le cas des cals témoins et inoculés, deux spots à  $R_f = 0,90$  et  $R_f = 0,93$  de fluorescence bleu fluorescente sont observés. Sous l'effet de l'inoculation, un spot additionnel est observé au dixième jour à l'origine du dépôt du spot (Tab. 17).

Les extraits de cals issus du génotype Flip 82 150 C présentent des chromatogrammes différents. Chez les cals témoins, révèlent quatre composés à  $R_f = 0; 0,67; 0,83$  et  $0,93$  dont les trois premiers sont uniquement présents au cinquième jour. Chez les cals inoculés, le composé à  $R_f = 0,93$  est également observé, et un spot supplémentaire à  $R_f = 0,88$  est révélé au premier stade et au quinzième jour de l'inoculation (Tab. (19)).

L'analyse chromatographique sur couche mince des extraits de cals issus du génotype ILC 200, des composés à  $R_f = 0,88$  et  $0,93$ , de fluorescence bleu fluorescente sont généralement repérés avec un spot supplémentaire à  $R_f = 0,76$  de fluorescence bleu fluorescente observé uniquement chez les inoculés.

Les chromatogrammes des extraits des cals du génotype ILC 483 (Tab. 22) révèlent des profils différents avec un nombre plus élevé de composés aussi bien chez les témoins que les inoculés, comparé aux autres génotypes. En effet quatre spots à  $R_f = 0; 0,83$  et  $0,88$  de fluorescence bleu fluorescente et  $R_f = 0,69$  de fluorescence jaune verdâtre sont chez les témoins, et sous l'effet de 'inoculation, des spots supplémentaires à  $R_f = 0,5$  et  $0,76$  de couleur orange et un à  $R_f = 0,11$  de fluorescence bleu fluorescente sont observés.

Dans le cas du génotype Zouaoui (Tab.21), deux spots à  $R_f = 0,88$  et  $0,93$  de fluorescence bleu fluorescente sont observés aussi bien chez les cals témoins et inoculés.

La chromatographie sur couche mince permet de séparer les composés organiques selon leur poids moléculaire et leur polarité. C'est une technique qui fractionne les substances naturelles pour les identifier et déterminer leur composition.

Il est remarqué que tous les composés séparés présentent des quenching à 254 nm et sont visibles sous forme de zones sombres et à 365 nm, des fluorescences (Annexe 4). Les différents spots observés chez tous les génotypes révèlent une fluorescence bleu fluorescente, orange ou

jaune qui s'intensifie après pulvérisation de la solution éthanolique du chlorure d'aluminium et seraient donc des flavonols, des flavones ou des isoflavones.

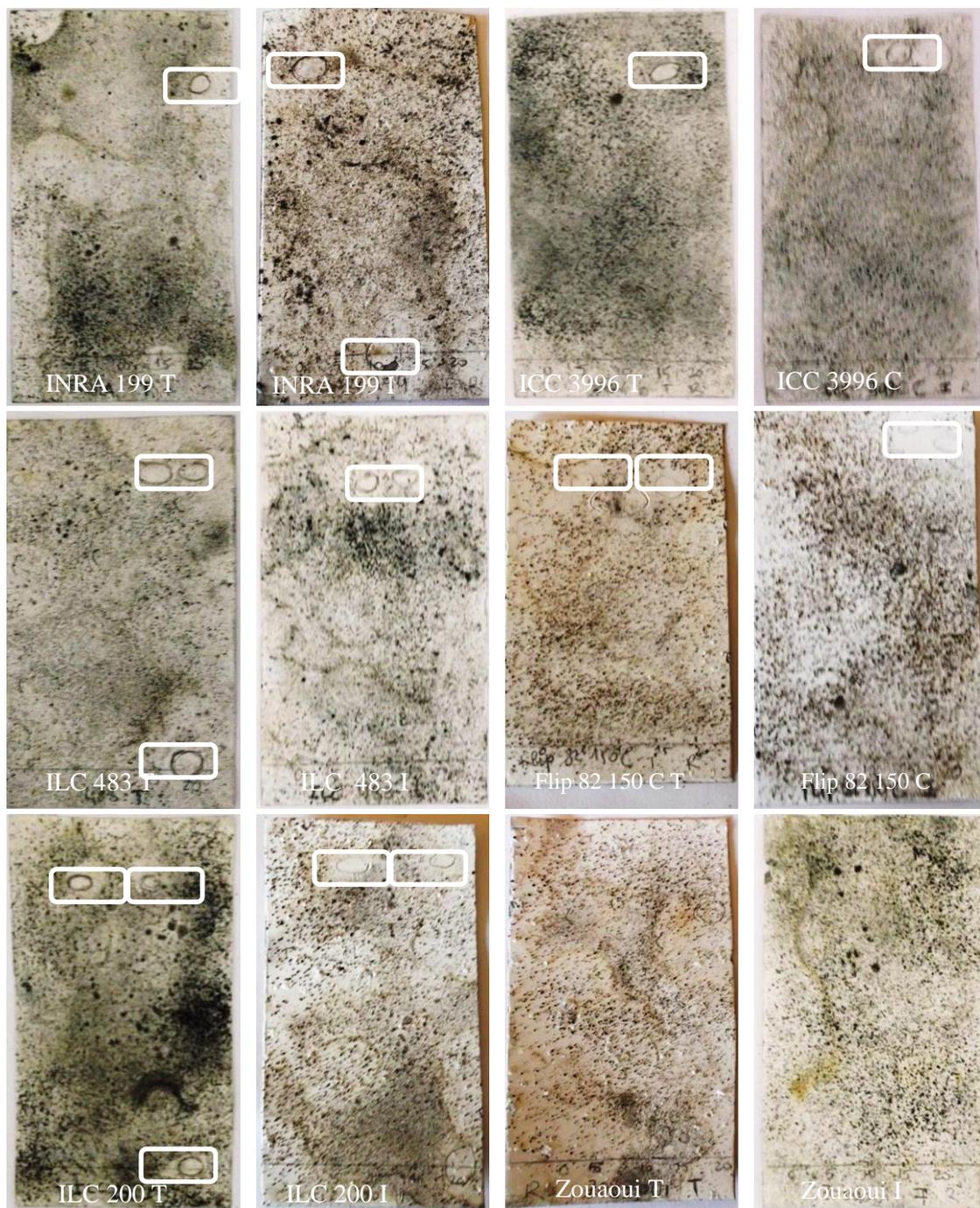
### 3.9. La bioautographie directe par chromatographie sur couche mince CCM

Les différents composés séparés par CCM puis confrontés à une suspension de spores d'*Ascochyta rabiei* montrent pour certains, une activité antifongique sur les plaques CCM.

En effet des zones d'inhibition sont observées. Les Rf correspondant aux zones d'inhibition sont résumés dans le tableau Tab. 23).

**Tableau.23.** Rapports frontaux des composés à activité inhibitrice sur la croissance d'*Ascochyta rabiei*

Génotype	traitement	Temps	Rf
INRA 199	T	20	0,88
	I	0	0,88
		10	0
Flip 82 150 C	T	5	0,93
		15	0,93
	I	15	0,93
		20	0,93
ILC 200	T	5	0,90
		15	0,90
		20	0
	I	5	0,93
		15	0,93
ICC 3996C	T	15	0,93
	I	15	0,93
		20	0,93
Zouaoui	T	-	-
	I	-	-
ILC 483	T	0	0,88
		20	0,88
	I	0	0,88
		15	0,88



**Figure 66.** Effet des extraits méthanoliques bruts des cals inoculés et témoins de *Cicer arietinum* sur *Ascochyta rabiei*.

Mise en évidence de l'activité antifongique par bioautographie directe sur CCM (silica gel 60 F<sub>254</sub> sur support d'aluminium et le système éthanol : eau : acide formique (18 :1 :1)).

Les composés à  $R_F=0,88$  présentent une activité biologique contre *Ascochyta rabiei* (Fig.66). ce composé est observé Chez INRA 199et ILC 483 chez les deux types de cal.inoculés et témoin. Il est remarqué également que le composé à  $R_f= 0,90$  actif contre l'agent pathogène, apparait uniquement chez les cals témoin du génotype. ILC 200. Le composé à  $R_f= 0,93$  apparait chez les cals des génotypes Flip 82 150 C, ILC 200 et ICC 3996 C. par ailleurs, aucune zone d'inhibition n'est observée pour les extraits des cals du génotype Zouaoui.

Les cals inoculés et témoins révèlent après séparation par chromatographie sur couche mince, la présence de composés actifs contre *Ascochyta rabiei*.

## Discussion

---

**Rapport-Gratuit.com**

## 4. Discussion

### 4.1. Initiation de la callogenèse

La mise en place d'un protocole de callogenèse rapide et reproductible est importante pour toute transformation chez le pois chiche *Cicer arietinum* de nature récalcitrante à la culture *in vitro*. Dans cette perspective, l'étude de l'effet de quelques facteurs régissant la callogenèse est entreprise chez des explants de folioles, d'entrenœuds et de cotylédons de sept génotypes de *Cicer arietinum* L. mis en culture sur le milieu MS modifié additionné de régulateurs de croissance. Après 1 mois de culture, un taux variable de callogenèse est obtenu. Cette différence est sous l'influence des effets individuels et interactifs de trois facteurs à savoir le génotype, la source d'explant mis en culture et les régulateurs de croissance ajoutés au milieu. Ces trois éléments réunis, sont décisifs pour l'expression du potentiel callogène chez *Cicer arietinum* L. (Arora et Chawla, 2005; Khan *et al.*, 2011; Kadiri *et al.*, 2013; Kadiri *et al.*, 2014).

Les résultats montrent que le taux de callogenèse diffère significativement selon le génotype utilisé. Zouaoui présente une réactivité plus élevée par rapport aux autres génotypes INRA 199, Bousahla, ILC483, Flip82 150C, ILC200 et ICC3996C. Khan *et al.* (2011) rapportent que la réponse de deux génotypes indigènes de pois chiche, KK1 et Hassan-2 K cultivés *in vitro* sous les mêmes conditions, expriment des aptitudes différentes à la callogenèse. Cette spécificité dans l'expression du potentiel callogène selon le génotype utilisé est souvent rapportée aussi bien chez le pois chiche (Rao et Chopra, 1987; Islam *et al.*, 1998; Arora et Chawla, 2005; Mirakabad *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2011) que chez d'autres dicotylédones herbacées comme la laitue (Mohebodini *et al.*, 2011); le tabac (Ali *et al.*, 2007); le coton (Zouzou *et al.*, 2008), des ligneuses, tels le noyer (Avilès *et al.*, 2009), le citronnier (Label *et al.*, 2015) ou des monocotylédones comme le palmier dattier (Sané *et al.*, 2012), le blé (Rashid *et al.*, 2009) et la canne à sucre (Gandounou *et al.*, 2005).

Sani et Mustapha (2010) attribuent l'hétérogénéité observée dans la réponse d'explants de canne à sucre cultivés *in vitro* à des caractéristiques inhérentes aux génotypes testés. Cette nature récalcitrante n'est pas totalement élucidée et peut être due aux caractéristiques physiologiques notamment aux taux d'hormones endogènes (Gautheret, 1959; Sané *et al.*, 2012).

Les résultats obtenus montrent que les explants de tiges, folioles et cotylédons mis en culture varient dans leur réponse. En effet, les segments d'entrenœuds et les folioles expriment un potentiel callogène plus élevé comparé aux cotylédons. La source d'explant influe sur la réponse de la callogenèse (Riazuddin *et al.*, 1988) et la spécificité de la réponse chez les différents organes ou tissus dépend de leur réactivité aux composants du milieu de culture (Zouzou *et al.*, 2008; Kouakou *et al.*, 2014) et leur capacité à se dédifférencier (Afshari *et al.*, 2011). Ceci est très souvent rapporté lors de la culture des tissus *in vitro* chez le pois chiche (Rao et Chopra, 1987; Riazuddin *et al.*, 1988; Barna et Wakhulu, 1993; Arora et Chawla, 2005) et d'autres espèces. Le type d'explant et éventuellement sa structure anatomique joueraient un rôle significatif dans l'initiation de la callogenèse (Zouzou *et al.*, 2008). Les cellules du parenchyme sont facilement reprogrammées vers la dédifférenciation (Fletcher *et al.*, 2011).

Le choix des hormones est déterminant pour l'induction de la callogenèse. Différentes formules de combinaisons hormonales d'auxines et de cytokinines sont testées pour évaluer la réponse *in vitro* des explants de pois chiche. Ces deux familles d'hormones sont connues pour leur effet direct et/ou indirect sur l'induction de la prolifération cellulaire et/ou leur orientation vers une organisation spécifique (Zrýd, 1988) et peuvent agir en synergie ou en antagonisme (Jones, 2011). Le type d'hormones utilisées pour les différentes réponses morphogénétiques ciblées, diffèrent d'un tissu à l'autre selon leur statut métabolique (Nafees *et al.*, 1999). Durzan *et al.* (1976) rapportent que l'eau, le carbone, l'azote et l'ATP doivent atteindre un seuil optimal dans les cellules pour être réactives et exprimer leur totipotence.

Les auxines favorisent l'induction et le maintien de la prolifération cellulaire (Boxus *et al.*, 1995), sont indispensables à la synthèse de l'ADN et jouent un rôle décisif dans la culture de tissu vu leur pouvoir stimulant la prolifération cellulaire (Gautheret, 1959; Neumann *et al.*, 2009). Les cytokinines permettent la division des cellules proprement dite et agissent avec les auxines pour stimuler leur multiplication (Gautheret, 1959).

Les résultats obtenus montrent que la combinaison entre une cytokinine (BAP) et une auxine, l'ANA ou le 2,4-D permet à un taux élevé d'explants d'exprimer leur potentiel callogène. Ainsi, les formules 2,4-D/BAP et ANA/BAP favorisent la formation de cals chez *Cicer arietinum*. Un résultat similaire est rapporté chez la même espèce par Rao et Chopra

(1987), Riazuddin *et al.* (1988), Sagare *et al.* (1993), Huda *et al.* (2000), Huda *et al.* (2003), Arora et Chawla (2005), Mirakabad *et al.* (2010), qui indiquent que la combinaison entre ces deux hormones induit la dédifférenciation puis la prolifération des cellules chez le pois chiche. L'utilisation simultanée d'auxines et de cytokinines est également favorable au déclenchement de la callogenèse chez différentes espèces comme le palmier dattier (Sani et Mustapha, 2010), la canne à sucre (Gopitha *et al.*, 2010), la courge cannellée (Sakpere *et al.*, 2014) et le citronnier (Savita *et al.*, 2010).

L'ajout d'auxines (2,4-D ou ANA) aussi bien seules que combinées semble produire un taux de cals relativement faible pour tous les géotypes testés. Ceci vient à l'encontre des résultats rapportés par Morjane et Harrabi (1993) qui indiquent que l'ANA stimule la formation de cals et ceux de Naz *et al.* (2008 b), Kumar *et al.* (2011) et Poorni *et al.* (2011) où l'emploi du 2,4-D favoriserait une bonne callogenèse chez le pois chiche. Cependant, chez la même espèce (Zaman *et al.*, 2010) et chez la fève (Almaghrabi, 2014), il est conclu que si la concentration du 2,4-D dépasse une valeur optimale, il influe négativement sur la callogenèse.

Il est par conséquent nécessaire de définir les besoins spécifiques de l'espèce et des géotypes à intérêt puisqu'il est impossible de donner un milieu de culture généralisé capable de déclencher la totipotence chez toutes les plantes (Riazuddin *et al.*, 1988; Nafees *et al.*, 1999).

Le brunissement des cals observé sur quelques milieux de culture est souvent remarqué lors de la culture de tissus *in vitro* chez le pois chiche (Naz *et al.*, 2008 (a) ; Mirakabad *et al.*, 2010; Aasim *et al.* 2011; Bharathi et Elavarasi, 2012), et également chez d'autres espèces comme *Sativa officinalis* (Oana-Maria *et al.*, 2011), la canne à sucre (Gandonou *et al.*, 2005), *Atriplex halimus* (Ighilhariz, 2008) et serait probablement dû à l'accumulation de polyphénols (Zrýd, 1988).

Les résultats obtenus concluent que la callogenèse chez *Cicer arietinum* L. dépend de l'interaction de plusieurs facteurs, à savoir le choix du géotype, la source de l'explant et la combinaison hormonale ajoutée au milieu de culture.

Le taux de cals obtenus chez le génotype Zouaoui est plus élevé par rapport aux variétés ICC 3996 C, INRA 199, Bousahla ILC 200, Flip 82150C et ILC 483. La réponse des explants varie en fonction de la composition du milieu en régulateurs de croissance. Cette prolifération cellulaire importante se manifeste en présence du 2,4-D et BAP ou 2,4-D et ANA pour les explants de tiges et de folioles, et ces derniers sont plus réactifs que les cotylédons.

#### 4.2. Histologie

La mise en culture des explants sur les milieux initie une déspecialisation ou dédifférenciation de certaines cellules appelées cellules cibles (Gueye *et al.*, 2009). Ces dernières indifférenciées, prolifèrent pour donner naissance à un cal dont la composition cellulaire peut être hétérogène (cellules méristématiques, parenchymes, tissus de conduction, etc.). Cette dédifférenciation peut être suivie par une organogenèse, une embryogenèse ou callogenèse.

L'étude histologique montre des cals formés de cellules parenchymateuses de petites tailles, avec des cellules à noyaux contrastés rappelant les cellules méristématiques. Ces formations sont rapportées par de nombreux auteurs Gautheret, (1959), Anzidei *et al.*, 2000 ; Seran *et al.*, 2007, Ighilhariz (2008), Neumann *et al.*, 2009. Par ailleurs, cette étude des cals a révélé la présence de tapis de trachéides néoformés. Ce phénomène est signalé dans le cas de *Cicer arietinum* (Kadiri *et al.*, 2012), *Glycine max* var. *Biloxi* (Fosket et Torrey, 1969), *Cocos nucifera* L (Dussert *et al.*, 1995), *Averrhoa carambola* L. (Koli, 2009). La prolifération de trachéides est observée sous l'effet de concentration inadéquate d'auxines (Gautheret, 1959) et leur formation implique la lyse de la vacuole et la dégradation du contenu cellulaire (Buchanan *et al* 2015). Par ailleurs, une polyploïdie est observée dans quelques cas. Cette anomalie chromosomique observée lors de culture de tissus *in vitro* (Niizeki, 1977; Longevialle, 1974)

Dans la seconde partie du travail, nous avons tenté d'étudier l'expression de la réaction de six génotypes de pois chiche INRA 199, ILC 200, ICC3996 C, Flip 82150C, ILC 483et Zouaoui au champignon phytopathogène *Ascochyta rabiei*. Des cals issus de culture de tissus *in vitro*, sont inoculés avec une suspension de spores du parasite. Le résultat de cette

interaction est suivi grâce à une étude histologique et cytochimique des coupes sériées d'échantillons des cals inoculés fixés et inclus dans la paraffine, après 12, 24, 48, 72h, 7 jours et 14 jours.

La sélection des plantes résistantes par le biais de la culture *in vitro* depuis le premier travail effectué par Colins en 1973 sur la tomate, constitue un outil très utilisé en phytopathologie (Miller *et al.*, 1984 ; Lebeda et Švábová, 2010). Les différentes méthodes conventionnelles utilisées dans la sélection des plantes résistantes malgré leur efficacité, présentent cependant quelques inconvénients notamment le temps nécessaire à leur accomplissement (Chand *et al.*, 2008), la difficulté de manipuler des plantes entières, le temps requis à leur croissance et à l'expression des symptômes (Jang et Tainter, 1990a). La recherche de nouvelles approches pour faciliter la sélection des espèces résistantes a mené à l'exploitation de la culture *in vitro* dans ce domaine (Trigiano *et al.*, 1984 ; Jacobi *et al.*, 1982 ; Singh *et al.*, 1999 ; Kumar *et al.*, 2014). Les nombreuses recherches menées sur l'interaction des hôtes avec leurs parasites, ont montré que les gènes de résistance et de sensibilité peuvent être exprimés aussi bien en utilisant comme système la plante entière ou simplement une culture tissulaire ou cellulaire (McComb *et al.*, 1987 ; Pijut *et al.*, 1990, Morpurgo *et al.*, 1994 ; Altman *et al.*, 2011). D'après Ingram (1967), les gènes de résistance au champignon parasite *Phytophthora infestans* peuvent être facilement exprimés chez la pomme de terre *Solanum tuberosum* en utilisant comme hôte aussi bien la plante entière qu'une culture de tissu à partir des tubercules. C'est le cas du tabac *Nicotiana tabacum* et son parasite *Peronospora tabacina* (Trigiano *et al.*, 1984) ainsi que dans le cas de plusieurs plantes herbacées et d'autres ligneuses (McComb *et al.*, 1987). Cependant, dans quelques cas la résistance à un agent pathogène exprimée *in vitro* peut ne pas être corrélée à celle observée chez la plante (Lepoivre, 2003).

Dans le cas du pathosystème *Cicer arietinum* *Ascochyta rabiei* et à la lumière des résultats obtenus, il est possible d'affirmer que l'expression de la sensibilité ou la résistance des génotypes par le biais d'un système qui utilise les cals et les spores est observable. Durant les premières 24 heures, la prolifération mycélienne est relativement identique sur les cals issus des différents génotypes. Une nette différence n'apparaît qu'au cours des 48h qui suivent l'inoculation et s'accroît de plus en plus au cours du temps. Les travaux de

Kavousi *et al.* (2009) montrent en effet que la réelle expression des gènes de résistance chez les génotypes de *Cicer arietinum* résistants à *Ascochyta rabiei* ne commence que 48 heures après l'infection. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Fondvilla *et al.* (2015) qui indiquent que durant les premières douze heures, seule la germination de quelques spores peut être observée et plus de 48 heures sont nécessaires au pathogène pour pénétrer les tissus de l'hôte. Selon Gallão *et al.* (2007), c'est le temps nécessaire au déclenchement de nombreuses réactions biochimiques en réponse à l'infection. En effet, après 48 heures, les calcs d'INRA 199 ILC 200, Flip 82150C et ICC 3996 C, montrent une réaction franche de résistance. Le mycélium s'y développe lentement et faiblement dans l'espace intercellulaire. Sa présence est limitée aux trois à cinq premières couches de cellules du cal. Cette croissance limitée et faible du parasite dans le cal caractérise la réaction de résistance chez la majorité des pathosystèmes étudiés. C'est le cas des calcs de soja inoculés avec *Phytophthora megasperma* Drechs (Holliday et Klarman, 1978), la luzerne/ *Fusarium oxysporum* (Mehrotra et Aggarwal, 2013) la betterave sucrière inoculée avec *Peronospora farinosa* f.sp. *betae* (Ingram et Joachim 1971), ceux du tabac *Nicotiana tabacum* inoculés avec le champignon *Phytophthora parasitica* var. *nicotinae* (Zoeten *et al.*, 1982) et dans le cas des calcs résistants de *Nicotiana tabacum*, *Zea mays* et *Triticum* sp., inoculés avec *Phytophthora cinammomi* (McComb *et al.*, 1987). Le même type de réaction est remarqué chez plusieurs autres espèces de plantes résistantes cultivées *in vitro* et inoculées avec des parasites (McComb *et al.*, 1987 ; Kavousi *et al.* ; 2009 ; Jang et Tainter, 1990(a) Jang et Tainter, 1990(b) ; Casarez *et al.*, 1994 ; Dai *et al.*, 1995).

La prolifération des hyphes dans l'espace intercellulaire témoigne de la production du pathogène d'enzymes à savoir la polygalacturonase (PG) et la pectine methyl-esterase (PME) qui dégradent la pectine composante principale de la lamelle moyenne. Par ailleurs, les calcs des génotypes résistants réagissent à l'infection également par la formation *de novo* de composés phénoliques dont le rôle est connu dans la résistance (Clériveret *et al.*, 1996; Macheix *et al.*, 2005; Lattanzio *et al.*, 2006) . Ils s'accumulent dans les cellules qui constituent une couche discontinue intermédiaire entre la zone de prolifération du mycélium et le centre du cal. Ce type de substance est retrouvé dans tous les exemples de cultures tissulaires ou cellulaires de type résistant élicitées comme le riz/*Pyricularia oryzae* (Uchiyama *et al.*, 1983), *Solanum tuberosum*/*Phytophthora infestans* (Ingram, 1967),

*Sorghum bicolor* (Praphu *et al.*, 1983), *Pennisetum glaucum* /*Sclerospora graminicola* (Upadhyaya, 1992), les tubercules de pomme de terre/*Phytophthora infestans* (Doke et Tomiyama, 1980) et *Vitis vinifera*/*Plasmopara viticola* (Bruno et Sparapano, 2007). Selon Ameziane El Hassani (1981) les génotypes de pois chiche résistants réagissent à *Ascochyta rabiei* par l'accumulation de composés phénoliques sur une zone cellulaire ``boundaryzone`` qui stoppe la croissance du mycélium. En dehors de cette région, le parasite occupe les espaces intercellulaires (Jang et Tainter, 1990 a). Le rôle de ces phénols est maintenant connu dans la résistance des plantes (Kessmann *et al.*, 1990 ; Weidmann *et al.*, 1991; Paiva *et al.*, 1994; Conceição *et al.*, 2006; Khan *et al.* 2005). Chez le pois chiche comme toutes les légumineuses l'accumulation d'isoflavonoïdes est constatée en réponse à une infection (Gustine *et al.*, 1978 ; Daniel *et al.*, 1988 ; Lepoivre, 2003 ; Kavousi, 2009). Ces phénols formés *de novo* chez les génotypes résistants sont appelé phytoalexines. Ils viennent s'ajouter aux phénols de constitution (Lepoivre, 2003 ; Vidhyasekaran, 2004 ; Agrios 2005) pour augmenter la résistance. Ils sont mis en évidence par le bleu fluorescent de toluidine chez les cals témoins non inoculés. Ceci rejoint les résultats obtenus par Kessmann *et al.* (1990) et Weidemann *et al.* (1991) dans des cultures cellulaires de génotypes sensibles et résistants de *Cicer arietinum* à *Ascochyta rabiei*.

Au septième jour, la progression des hyphes se poursuit. Ils s'enchevêtrent et forment quelques pycnides sur les cals des génotypes résistants. Les mêmes observations sont rapportées par Höhl *et al.*(1990) qui remarqua la formation de quelques pycnides sur une plante de pois chiche d'une espèce résistante à *Ascochyta rabiei* contrairement à Ameziane El Hassani (1981) selon qui, le champignon ne forme aucune pycnide sur les génotypes résistants de *Cicer arietinum*. La formation de fructifications chez cals des génotypes résistants est rapportée dans plusieurs cas de pathosystèmes tels *Nicotiana tabacum*/*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Zoeten *et al.*, 1982) ; *Vitis* spp./*Plasmopara viticola* (Dai *et al.*, 1995) et *Ulmus pumila* /*Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf (Krause *et al.*, 1996).

La résistance sur des cals s'exprime également par la réaction d'hypersensibilité. Grâce à des signaux émis par les cellules qui sont en contact avec le parasite, d'autres cellules plus éloignées meurent et forment des nécroses pour stopper la progression du pathogène (Rajab

*et al.*, 2009). *In vivo*, les plantes répondent quelques fois à l'infection par la mort programmée de quelques cellules œuvrant ainsi à stopper la prolifération du pathogène (Rea *et al.*, 2002). *In planta*, elle s'exprime par des tâches nécrotiques ou réaction d'hypersensibilité (Lepoivre, 2003). Ce phénomène est également rapporté dans quelques cas de cals résistants élicités comme le pin/ *Phytophthora cinnamomi* (Jang et Tainter, 1990 a) et le Soja/*Phytophthora megasperma* (Holiday et Klarman, 1979).

Les cals issus du génotype ILC 483 considéré comme sensible à *Ascochyta rabiei* et Zouaoui montrent une réaction de sensibilité totale au champignon. Après 48 heures de l'inoculation, le mycélium prolifère rapidement à travers les espaces intercellulaires et forme des pycnides sur la périphérie du cal avec une importante production de beaucoup de spores. La colonisation rapide du cal avec une production massive de fructifications est une caractéristique commune rapportée dans tous les pathosystèmes étudiés. C'est le cas de *Triticum aestivum* inoculé avec *Neovossia indica* (Singh et Singh, 1992) et *Castanea sativa* infecté avec *Phytophthora cambivora* (Casares *et al.*, 1994). Quelques cellules accumulent des composés phénoliques chez les cals issus du génotype Zouaoui. Néanmoins, ils ne garantissent aucune résistance à l'hôte et ceci peut être expliqué soit par leur quantité infime, soit par le pouvoir de détoxification du pathogène (Jayakumar *et al.*, 2005). En effet d'après Kraft et Barz (1985), les souches virulentes d'*Ascochyta rabiei* ont le pouvoir de dégrader les polyphénols de défense de l'hôte.

#### 4.3. Effet de l'inoculation par la suspension de spores d'*Ascochyta rabiei* sur le profil biochimique des cals

Les plantes comptent dans leur environnement naturel plusieurs agresseurs biotiques et abiotiques (Lattanzio *et al.*, 2006). Elles interagissent avec en particulier les pathogènes et essaient de se défendre à travers des dispositifs préformés ou induits (Jaiswal *et al.*, 2012). La compréhension de l'interaction entre les plantes et les pathogènes permet d'accomplir de rapides progrès susceptibles de garantir une sécurité alimentaire durable (Andolfo et Ercolaro 2015). Selon Lygin *et al.* (2009), il est important d'étudier les voies métaboliques de la réponse de plusieurs génotypes à différentes sensibilités vis-à-vis de l'agent pathogène *Ascochyta rabiei* dans le but d'assister les efforts fournis pour le développement et l'amélioration des variétés. La réponse à l'attaque par ses organismes peut s'exprimer par

des mécanismes de tolérance ou résistance qui permettent la survie de la plante (Lattanzio *et al.*, 2006). Elle tente de limiter l'accès du pathogène aux nutriments et initie des réponses immunitaires alors que le pathogène déploie des stratégies d'adaptation pour supprimer l'immunité de l'hôte et accéder aux nutriments (Morkunas et Ratajczak, 2014). Ce phénomène complexe produit des modifications de leur métabolisme (Patil *et al.*, 2011), ou certaines voies cibles (Ashry et Mohamed, 2011). Pour survivre à ces conditions défavorables, l'hôte accumule des substances notamment les protéines solubles nécessaires pour la protection des enzymes, les sucres pour l'apport énergétique (Zhang *et al.*, 2014), les phénols (Patil *et al.*, 2011) et les flavonoïdes (Davar *et al.*, 2012). Ces composés jouent un rôle prépondérant dans la résistance des plantes à divers pathogènes (Maurya *et al.* 2005). Ces changements peuvent être induits chez différents pathosystèmes dont le modèle utilisé dans cette recherche. En effet, les cultures cellulaires ou tissulaires végétales peuvent servir comme modèle pour étudier les changements biochimiques relatifs aux réponses de l'hôte aux pathogènes (Daniel *et al.*, 1988 ; Zhao *et al.*, 2012). L'utilisation de populations génétiquement homogènes inoculées représentent un modèle utile pour étudier les réactions biochimiques des plantes lors des réactions de défense (Daniel *et al.*, 1988, Trigiano, 2007)

Les cals obtenus par culture *in vitro* de tissus de différents génotypes de pois chiche *Cicer arietinum* L. puis inoculés avec une suspension de spores d'*Ascochyta rabiei* révèlent des modifications dans leur métabolisme.

#### *Les sucres*

Les sucres suscitent un intérêt particulier car ils jouent un rôle important durant l'interaction hôte pathogène (Trouvelot *et al.*, 2014) et jouent un rôle dans la résistance des plantes aux champignons pathogènes (Morkunas et Ratajczak, 2014). Ce sont une source de carbone (Subba Rao, 1987) et d'énergie (Moghaddam et Van den Ende, 2012), interviennent dans la synthèse des différentes molécules de défense comme les composés phénoliques, les phytoalexines (Sunitha et Subramanian, 2014) ou agissent comme molécules signal durant l'interaction (Sudha et Ravishankar, 2002 Trouvelot *et al.*, 2014). L'évolution de l'accumulation des sucres solubles est variable chez les différents génotypes testés. Leur taux diminue significativement chez les génotypes sensibles ILC 483 et Zouaoui comparés aux génotypes résistants, INRA 199, ILC 200, ICC 3996C et tolérant Flip 82 150 C. Ceci

concorde avec les résultats obtenus par Hamid *et al.* (2014) chez *Glycine max* inoculé avec *Fusarium solani*. Le taux de sucres solubles diminue généralement chez les génotypes sensibles dans différents pathosystèmes: *Colocasia esculenta* (L.) Schott/ *Phytophthora colocasiae* (Misra *et al.*, 2008), *Cicer arietinum*/ *Ascochyta rabiei* (Kumar *et al.*, 2010); *Bipolaris sorokiniana* (Sacc) Shoem (Patil *et al.*, 2011); *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc./ *Brassica juncea* et *Brassica alba* (Mathpal *et al.*, 2011). Ainsi, l'hôte est stimulé pour mobiliser ses réserves en sucres. Ces sources d'énergie sont exploitées pour la respiration et les réactions de défense. Dans quelques cas, chez les génotypes sensibles, l'inoculation déclenche une augmentation du taux de sucres solubles dans une première phase avant la sporulation du champignon puis diminue rapidement (Aldesuquy et Baka 1991). Ce métabolite peut être considéré comme un indice sur le type de métabolisme inhérent à la plante et détermine sa capacité à résister aux parasites (Subba Rao, 1987 ; Patil *et al.*, 2011). Chez les génotypes sensibles infectés, le catabolisme des sucres est accéléré (Sudha et Ravishsharkar *et al.*, 2002) sous l'effet d'une hydrolyse rapide par les enzymes du parasite (Mathpal *et al.* 2011). Wang *et al.* (2014) explique la diminution dans le taux de sucres solubles chez *Hevea brasiliensis* infecté avec *Oidium heveae* steinm avec la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ils sont utilisés dans processus antioxydants telle la voie du pentose phosphate (Couée *et al.*, 2006), agissent en synergie avec les phénylpropanoïdes dans la détoxification de ces espèces (Tarkowski Van den Ende, 2015) et contribuent à la tolérance du stress (Moghaddam *et al.*, 2010). Les sucres sont aussi utilisés comme nutriment par le pathogène (Aldesuquy et Baka, 1991 ; Kumar *et al.*, 2010 ; Al Wakeel *et al.*, 2013), pour son développement et sa survie (Singh, 2000). Al Wakeel *et al.* (2013) lie l'accumulation des sucres chez le pathosystème tournesol/*Macrophomina phaseolina*, à une augmentation dans l'activité des invertases chez l'hôte.

L'interprétation de la résistance selon le taux de sucres est difficile vu que le pathogène interfère avec le métabolisme de son hôte non seulement en puisant des sucres et d'autres métabolites, mais il modifie le métabolisme à différents degrés. Plusieurs travaux sont réalisés sur le métabolisme des glucides en réponse à l'invasion du pathogène et les résultats sont contradictoires (Subba Rao, 1987).

### *Les protéines*

Les plantes possèdent des mécanismes préformés et induits pour résister à l'invasion du pathogène. Une fois le contact établi, les éliciteurs produits par le pathogène induisent entre autres la synthèse de protéines reliées (PR) la pathogenèse (Davar *et al.*, 2012). Les protéines représentent une classe de composés utilisés comme marqueurs biochimiques de l'infection. L'interaction entre l'hôte et le parasite exerce un effet sur la synthèse des protéines de l'hôte et son activité enzymatique. La vitesse d'une telle réaction peut être décisive dans la sensibilité ou la résistance de l'hôte (Sudha et Ravishankar, 2002). Selon Subba Rao (1987), l'évolution quantitative du contenu protéique lors d'infection par des champignons est relative à la résistance où la sensibilité des plantes.

Le suivi de l'évolution du taux de protéines totales chez les cals des différents génotypes de pois chiche montre des résultats variables. Une augmentation est observée chez les cals des différents génotypes résistants inoculés à savoir INRA 199, ILC 200, ICC 3996C et tolérant, Flip 82150C. Ceci rejoint les résultats observés chez *Cajanus cajan* (L.) Millsp inoculé avec *Fusarium oxysporum* udum (Sunitha et Subramanian, 2014) et *Helianthus annuus* L. avec *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (Davar *et al.* 2012).

Les cals issus des génotypes, ILC 483 et Zouaoui montrent une nette diminution du taux de protéines sous l'effet de l'inoculation avec les spores d'*Ascochyta rabiei*. La même évolution est observée chez *Hibiscus cannabinus* L. infecté avec *Begomovirus* (Chatterjee et Ghost, 2008), *Capsicum annuum* inoculé avec *Verticillium dahliae* (Goicoechea *et al.*, 2000) et *Brassica juncea*, *B.alba* /*Alternaria brassicae* (Mathpal *et al.*, 2011), La pénétration du pathogène modifie le métabolisme des protéines et leur taux diminue chez les plantes sensibles (Sunitha et Subramanian, 2014) suite à leur dénaturation (Chatterjee et Ghost, 2008). Le taux de protéines peut subir une diminution liée à la disparition de certaines activités enzymatiques et la stimulation d'autres (Subba Rao, 1987) mais également à la dégradation des protéines (Kumar *et al.*, 2011).

Par ailleurs, les résultats obtenus montrent que l'accumulation des protéines est corrélée négativement avec le temps aussi bien chez les cals témoins qu'inoculés. Chez *Hordeum vulgare* L. inoculé avec *Helminthosporium sativum*, Kumar *et al.* (2011) lient la réduction du taux de protéines à la diminution du métabolisme de l'azote et la conversion des nitrates en

nitrite et l'induction des gènes codant les protéines PR sont associés (Berber et Önlü, 2012). L'activation des gènes liés à la défense aboutie à la synthèse des protéines relatives à la pathogénèse ou protéines PR. Elles regroupent des inhibiteurs de protéases qui inactivent les enzymes du pathogène et des enzymes lytiques des cellules de l'agent pathogène (Hopkins, 2003) dont des enzymes du métabolisme secondaire, les protéines PR et les protéines de régulations qui contrôlent l'expression d'autres gènes reliées à la défense. Les protéines PR dégradent la paroi du champignon pathogène causant la lyse des cellules (Davar *et al.* 2012).

Leur synthèse est également observée lors de l'utilisation d'éliciteurs tels la chitine et le glucane, composants de la paroi fongique qui confirme la présence ou reconnaissance de récepteurs spécifiques pour ces molécules. Nehra *et al.* (1994) rapportent que chez le pois chiche infecté par *Ascochyta rabiei* l'activation de la chitinase se fait au 6<sup>ème</sup> jour et elle est plus élevée chez les résistants.

Cependant il est important de noter que l'estimation globale des protéines concerne aussi bien les protéines de défense et celles liées aux modifications structurales des cellules ou la division et prolifération cellulaire (Lippmann *et al.*, 2009). Il est certain que l'approche globale effectuée peut masquer des variations individuelles dans la concentration des protéines de défense. Leur séparation par électrophorèse permettrait la mise en évidence d'éventuelles variations au niveau moléculaire. (Subba Rao, 1987).

#### *Les composés phénoliques*

Les plantes utilisent des mécanismes non spécifiques pour éliminer le champignon comme l'augmentation du taux des composés phénoliques (Misra *et al.* 2008). De tous les composés biochimiques chez l'hôte ces derniers sont identifiés comme responsables de la résistance chez plusieurs plantes. Ils peuvent entraîner le ralentissement de l'infection ou l'arrêt total de la propagation (Chatterjee et Gosh, 2008 ; Kumar *et al.*, 2011) ou seraient aptes à inhiber les toxines des pathogènes (Subba Rao, 1987).

Les composés phénoliques peuvent être constitutifs « anticipines » et agissent comme inhibiteurs préformés et d'autres produits *de novo*, appelés phytoalexines constituent la réponse active des tissus infectés. Les différents résultats obtenus montrent que le taux de

polyphénols augmente chez les cals inoculés comparé aux témoins. Mathpal *et al.* (2011) mentionnent que les composés phénoliques sont plus élevés chez les infectés comparés aux témoins et que leur concentration jouerait un rôle dans la résistance en inactivant les enzymes produits par le pathogène

En effet, cette augmentation est plus rapide chez INRA199, ICC 3996C, ILC 200 caractérisés comme résistants ou Flip 82 150 C comme tolérant, comparés au génotype sensible, ILC 483 et Zouaoui. Chez les cellules d'un génotype de pois chiche résistant à *Ascochyta rabiei*, la réponse se traduit par une accumulation de phénols précoce et rapide pour isoler le pathogène (Kavousi *et al.* 2009). Ces auteurs ont noté une augmentation des composés phénoliques constitutifs et des phytoalexines pour inhiber l'extension du mycélium. Elle est corrélée à la synthèse de la phénylalanine ammonia lyase (PAL), enzyme clé des phénylpropanoïdes. Dans le cas des génotypes sensibles, ces composés sont inhibés ou dégradés par le pathogène suite à la dégradation ou l'inhibition de la PAL par le pathogène (Sarwar *et al.* 2001).

Des concentrations élevées causent une action létale instantanée sur les constituants cellulaires du parasite alors que les faibles concentrations qui induisent un effet toxique graduel sont rapidement détoxifiées par le pathogène provoquant ainsi un ralentissement de l'inhibition (Rouxel, 1989 ; Höhl *et al.*, 1989).

Ceci concorde avec les résultats rapportés par Datta et Lal (2012) chez *Cicer arietinum* et *Cajanus cajan*s inoculés avec des spores de *Fusarium* sp. Chatterjee et Ghosh (2008) suggèrent que la défense, chez les génotypes résistants, se caractérise au début par une accumulation de composés phénoliques au site d'infection, un ralentissement de la propagation du pathogène suite à une mort rapide des cellules de l'hôte alors que chez les sensibles les phénols diminuent avec le développement des symptômes en faveur d'une prolifération du pathogène. Ainsi, une accumulation rapide et élevée des composés phénoliques est généralement observée chez les résistants aux premiers stades de l'infection et limiteraient la propagation du pathogène (Mathpal *et al.*, 2011 ; Patil *et al.*, 2011). Cependant, Kumar *et al.* (2011) signalent que le niveau de résistance génotypique n'est pas corrélé à la teneur en composés phénoliques et notent et que le taux de ces composés est plus faible chez les résistants comparés aux sensibles. Chez les génotypes sensibles de *Glycine*

*max* inoculés avec *Fusarium solani*, au stade initial où l'intensité de l'infection est faible, le taux de polyphénols est élevé (Hamid *et al.*, 2014). Chez le niébé, l'accumulation élevée des composés phénoliques chez les génotypes sensibles proviendrait de la destruction des parois (Datta et Lal, 2012).

Chez l'arachide, aucune corrélation n'a pu être établie entre le niveau de résistance génotypique et le taux de composés phénoliques (Subba Rao, 1987). Selon Uchyama *et al.* (1983) et Patil *et al.* (2011), la biosynthèse et le métabolisme des phénols est plus affecté par les conditions de culture *in vitro* que par le pathogène.

Par ailleurs, il est noté que l'accumulation de polyphénols est positivement corrélée à celle des sucres solubles et ces derniers en sont les précurseurs (Trouvelot *et al.*, 2014). Chez les cals de génotypes résistants testés, le taux de phénols plus élevé est corrélé au taux de sucres élevés. De plus, les composés phénoliques doivent être libérés et convertis pour être fongistatique. Leur coexistence avec les sucres et des phénols induits leur glycosylation et formation de glycosides phénoliques garantissant une meilleure efficacité dans l'expression de la résistance (Mathpal *et al.*, 2011).

### *Les flavonoïdes*

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires produits par les plantes présents à travers le règne végétal. Plus de 9000 composés de ce groupe sont connus et participent à la protection des plantes contre les stress biotiques et abiotiques (Lattanzio *et al.*, 2006). Ils ont une propriété antioxydante. Ils contribuent à l'épaississement des structures de la plante en modifiant l'activité de l'acide indole acétique ce qui engendre un déclenchement de différenciation de tissus et formation de callose et de tylose qui obstruent le système vasculaire pour stopper l'infection. Les flavonoïdes sont transportés au site de l'infection et induisent une réaction d'hypersensibilité et la mort cellulaire. Ils peuvent aussi être directement impliqués dans l'inhibition des enzymes du pathogène spécialement ceux responsables de la dégradation de la paroi de l'hôte. Ils peuvent empêcher l'adhésion du pathogène et le transport transmembranaire des protéines. Ils peuvent également déstabiliser la membrane du pathogène, change sa fluidité et peut également déstabiliser la chaîne respiratoire (Mierziak *et al.*, 2014). Les résultats obtenus montrent que le taux de flavonoïdes

augmente sous l'effet de l'inoculation plus particulièrement chez les génotypes résistants et diminue avec le temps. La même observation est rapportée chez le soja infecté par *Macrophomina phaseolina* (Bellaloui *et al.*, 2012). Cependant, le taux de flavonoïdes n'est pas toujours corrélé au développement des symptômes (Scarpari *et al.*, 2005) et leur taux peut diminuer chez l'inoculé (Mathpal *et al.*, 2011).

#### 4.4. Etude qualitative des composés phénoliques et bioautographie

La chromatographie sur couche mince est une méthode qui permet de séparer les composants d'un produit à des fins analytiques telle la caractérisation de composés liés à la défense lors des interactions plantes pathogènes (Narayanasamy, 2001). Les extraits développés sur les plaques par chromatographie sur couche mince avec les différents solvants montrent des profils de migration et de séparation différents. La mise au point d'un système optimal est nécessaire puisqu'aucun système standard n'existe (Nollet, 2004). Le système éthanol : acide formique : eau distillée garantit une migration et une séparation appréciables. Liu *et al.* (2014), notifient que l'éthanol augmente la solubilité des flavonols et l'acide formique leur stabilité dans l'eau. L'analyse des chromatogrammes révèle la présence de spots à différents Rf et fluorescences bleu fluorescente, orange et jaune qui s'intensifient par la vaporisation du révélateur. En effet selon Pothier (1996), ces composés peuvent être détectés sur les plaques de chromatographie sur couche mince contenant un indicateur fluorescent car ils provoquent une fluorescence quand ils sont irradiés avec la lumière ultraviolette à 254 nm, ou 365 nm selon leur structure. Les flavonoïdes qui donnent une fluorescence bleu fluorescente ou verte qui s'intensifie avec le révélateur approprié.

Les extraits séparés par chromatographie sur couche mince révèlent la présence de composés phénoliques de types flavones, flavonols ou isoflavones chez les calcs témoins et inoculés de tous les génotypes. Ces derniers, sont parmi les constituants phénoliques accumulés dans les cultures cellulaires du pois chiche (Barz et Mackenbrock, 1994) et chez d'autres légumineuses comme la fève et le soja (Yu *et al.*, 2000). Ils sont identifiés chez le soja (Graham, 1995), la luzerne (Blount *et al.*, 1992) et le pois chiche (Mackenbrock *et al.*, 1992). Daniel et Barz (1990) observent une accumulation *in vitro* des isoflavones dans les cellules de pois chiche saines. En effet, il est établi que les flavonoïdes peuvent être une composante de la défense constitutive de l'hôte (Lepoivre, 2003; Mierziak, 2014). Cependant, les résultats obtenus révèlent la présence d'autres composés phénoliques uniquement chez les

cals confrontés à *Ascochyta rabiei*. Daniel et Barz (1990) rapportent que medicarpin et maackain, sont les isoflavones accumulés dans des cultures cellulaires de *Cicer arietinum* en réponse à l'inoculation avec cet agent pathogène.

Ces composés peuvent ainsi être considérés comme des phytoalexines puisqu'ils sont produits *de novo* en réponse à l'infection.

Afin d'évaluer l'activité inhibitrice de ces composés sur la croissance d'*Ascochyta rabiei*, une chromatographie plane est combinée à la détection biologique ou bioautographie. C'est une méthode rapide et peu coûteuse utile pour un screening chimique et biologique avec la révélation de molécules actives contre *Ascochyta rabiei* (Bahr *et al.*, 2016). Seuls quelques composés séparés par CCM, appartenant à la classe des isoflavones montrent une activité antifongique et inhibent *in situ* la croissance d'*Ascochyta rabiei*. L'inefficacité des composés est liée soit à leur dégradation rapide (Huang, 2013) et/ou à leur faible concentration (Seigler, 2012).

# Conclusion générale et perspectives

---

## 5. Conclusion générale et perspectives

Le pois chiche est une légumineuse d'importance capitale dans l'alimentation et l'économie dans plusieurs régions. Cette plante est soumise à des stress biotiques dont le champignon *Ascochyta rabiei* agent de l'antracnose qui peut causer la perte totale de la récolte. L'étude de cette maladie présente un intérêt particulier pour les phytopathologistes, les sélectionneurs et les services de protections de cultures.

Bien que des techniques de lutte existent, leur utilisation reste insuffisante et la sélection de variétés résistantes présente ainsi la solution de choix. Sa mise en pratique par le biais de la culture de tissus *in vitro* constitue une alternative prometteuse pour la sélection de clones à caractères intéressants. Ainsi, il est donc nécessaire de connaître les mécanismes accompagnant la pathogénèse chez l'hôte, en particulier ceux liés à la réaction de la plante à l'action du parasite.

Le test de pathogénicité sur des folioles détachées réalisé *in vitro*, confirme le type de réaction des différents géotypes de pois chiche utilisés à l'agent pathogène et révèle que Zouaoui est un géotype sensible à *Ascochyta rabiei*.

Le pathosystème utilisé nécessite la production de cals par la culture de tissus *in vitro* à partir de différents géotypes de pois chiche. A cet effet, dix-sept différentes balances hormonales additionnées au milieu de Murashige et Skoog sont testées. Seuls cinq semblent favorables à l'initiation de la callogenèse chez *Cicer arietinum*. La nature récalcitrante du pois chiche à la culture *in vitro* et le brunissement des cals observé, sont contournés par l'utilisation du MS modifié par la diminution du saccharose. La production de cals utilisés comme hôte nécessiterait de tester d'autres milieux nutritifs tel le milieu Gamborg avec de plus faibles concentrations de saccharose et d'autres types de régulateurs de croissance pour optimiser l'initiation puis la prolifération des cals.

Le milieu MS modifié additionné de 0,5 mg/l de 2,4-D et 1 mg/l de BAP est utilisé pour la production des cals utilisés comme hôte. Ils sont obtenus par culture de tissus *in vitro* à partir de différents géotypes de pois chiche, puis inoculés avec les spores d'*Ascochyta rabiei*, présentent des réactions variées aussi bien sur le plan biochimique qu'histologique.

L'étude histologique révèle une colonisation rapide des cals issus des géotypes sensibles comparés aux résistants. De plus il est remarqué que le champignon occupe exclusivement l'espace intercellulaire des tissus de l'hôte. Ce dernier réagit par l'accumulation de composés phénoliques, plus exprimée chez les résistants.

L'étude histo-cytochimique confirme ce résultat. Les cellules de l'hôte produisent en effet des phénols et des flavonoïdes retrouvés aussi bien chez les cals témoins qu'inoculés issus de tous les génotypes. Leur production est cependant plus intense dans le cas des cals résistants, INRA 199, ICC 3996 C et ILC 200.

Des variations au niveau du métabolisme primaire et secondaire sont également enregistrées. Elles concernent le taux de sucres solubles totaux, des protéines, des polyphénols et des flavonoïdes.

Concernant le pool protéique, il est impossible de relier directement les variations à la résistance ou la sensibilité des différents génotypes étudiés. Ceci est dû à l'approche globale entreprise d'où l'intérêt d'approfondir l'étude et cibler les protéines liées à la pathogenèse (PR) par électrophorèse.

Les extraits des différents cals sont séparés par chromatographie sur couche mince. Cette méthode préparative révèle la présence de flavonoïdes constitutifs et induits dont quelques-uns révèlent une activité inhibitrice sur *Ascochyta rabiei*. Toutefois, il serait souhaitable d'identifier ces composés par des techniques spectroscopiques qualitatives telle la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Il serait également souhaitable de purifier ces flavonoïdes puis tester *in vitro* sur *Ascochyta rabiei*.

# Références bibliographiques

---

Rapport-Gratuit.com

## 6. Références Bibliographiques

-A-

- Aasim M., Day S, Rezaei F., Hajizadeh M., Mahmud S. T, Ozcan S., 2011. *In vitro* shoot regeneration from preconditioned explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cv. Gokce. African Journal of Biotechnology, 10(11):2020–2023.
- Abad, P., B. Favery. 2012. L'arsenal immunitaire des plantes. Dossier pour la Science 77: 24-31.
- Abate, T., Alene A. D., Bergvinson D., Shiferaw B., Silim S., Orr A., Asfaw S., 2012. Tropical Grain Legumes in Africa and South Asia: Knowledge and Opportunities. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 112p
- Afshari R., Angoshtari R., Kalantari S., 2011. Effects of Light and Different Plant Growth Regulators on Induction of Callus Growth in Rapeseed (*Brassica napus* L.) Genotypes. Plants Omics Journal, 4(2):60-67.
- Agrios G.N, 2005. Plant pathology. 5eme edition, ELSEVIER Academic Press, 922p.
- Akem, C., 1999. Ascochyta blight of chickpea: present status and future priorities. International Journal of Pest Management, 45(2):131-137.
- Akhtar, K. P., Saleem M. Y., Asghar M., Ali S. H. A. U. K. A. T., Sarwar N. I. G. H. A. T., Elahi M. T., 2012. Resistance of *Solanum* species to *Phytophthora infestans* evaluated in the detached-leaf and whole-plant assays. Pakistan Journal of Botany, 44(3): 1141-1146.
- Alabouvette, C., Olivain, C., & Steinberg, C., 2006. Biological control of plant diseases: the European situation. European Journal of Plant Pathology, 114(3), 329-341.
- Aldesuquy H. S., Baka Z. A. M., 1992. Physiological and biochemical changes in host leaf tissues associated with the growth of two biotrophic fungi growing in Egypt. Phytion (Horn, Austria), 32(1):129-142.
- Alexopoulos C.J., Mims C.W., Blackwell M., 1996. Introductory Mycology. Fourth edition. New York. USA: John Wiley and Sons, 868p.
- Ali G., Hadi F., Tariq M., Ali Khan, 2007. Callus induction and *in vitro* complete plant regeneration of different cultivars of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) on media of different hormonal concentrations. Biotechnology, 6(4): 561-566.
- Ali M.A, Nawab N.N., Abbas A., Zulkiffal M. et Sajjad M., 2009a. Evaluation of selection criteria in *Cicer arietinum* L. using correlation coefficients and path analysis, Australian Journal of Crop Science, 3(2) p.65-70.

- Ali S.A., Tayyab H., Sheikh R., 2008. Ascochyta blight of chickpea: Production of phytotoxins and disease management. *Biotechnology advances*, 26 (6): 511-515.
- Ali S.R., Iqbal Sh.M., Iqbal U., Ghafoor A. et Akram A., 2009 (b). Pathogenic diversity in *Ascochyta rabiei* (Pass.)Lib., of chickpea. *Pakistan Journal of Botany*, 41(1):413-419.
- Allison S. D., Schultz, J. C., 2005. Biochemical responses of chestnut oak to a galling cynipid. *Journal Of Chemical Ecology*, 31(1):151-166.
- Almaghrabi A., 2014. Effect of Growth Hormone 2, 4-D on Some Callus Traits of Different Faba Bean (*Vicia Faba* L.) Cultivars. *Life Science Journal*, 11(11).
- Altman, A. and P. M. Hasegawa, 2011. *Plant biotechnology and agriculture: prospects for the 21st century*. Academic press, 624 p.
- Al-Wakeel S., Gabr M., Abu-El-Soud W., Saleh A., 2013. Coumarin and salicylic acid activate resistance to *Macrophomina phaseolina* in *Helianthus annuus*. *Acta Agronomica Hungarica*, 61(1):23-35.
- Ameziane El Hassani A., 1981. Modalités d'expression de la résistance d'un cultivar de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) à *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. Thèse de Docteur Ingénieur, ENA de Rennes. 48p.
- Ameziane El Hassani T et Persoons, 1984. *Agronomie moderne Bases physiologiques et agronomiques de la production végétale*.Hatier-AUPELF-UREF, 544 p.
- Andolfo G. et Ercolano M. R., 2015. Plant Innate Immunity Multicomponent Model. *Frontiers in Plant Science*, 6:1-6.
- Anzidei M., Bennici A., Schiff S., Tani C., Mori B., 2000. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare*: histological observations of developing embryogenic callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61(1), 69-79.
- Armstrong-Cho, C., Gossen, B.D., 2005. Impact of glandular hair exudates on infection of chickpea by *Ascochyta rabiei*. *Canadian Journal of Botany*, 83: 22–27.
- Arora A., Chawla S. H., 2005. Organogenic plant regeneration via callus induction on chickpea (*Cicer arietinum*) role of genotypes, growth regulators and explants. *Indian Journal of Biotechnology*, 4: 251-256.
- Ashry N. A., Mohamed H. I., 2011. Impact of secondary metabolites and related enzymes in flax resistance and or susceptibility to powdery mildew. *World Journal of Agricultural Sciences*, 7(1):78-85.
- Avilés F., Ríos D., González R., Sánchez-Olate M., 2009. Effect of Culture Medium in Callogenesis from Adult Walnut Leaves (*Juglans regia* L.). *Chilean journal of agricultural research*, 69(3):460-467.



-B-

- Bahr L., Castelli M. V., Barolo, M. I., Mostacero N. R., Tosello M. E., López S. N., 2016. Ascochyta blight: Isolation, characterization and development of a rapid method to detect inhibitors of the chickpea fungal pathogen *Ascochyta rabiei*. *Fungal Biology*, 120(3): 424-432.
- Baker, K., Cook R. J., 1974. *Biological control of plant pathogens*, WH Freeman and Company, 433p.
- Barna K. S., Wakhulu A. K., 1993. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from callus culture of chickpea (*Cicer arietinum* L). *Plant Cell Report* 12: 521-524.
- Barnett H. L., Hunter B. B.m 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi* (Vol. 3340). Minnesota: APS press, 218 p.
- Barz W., Mackenbrock U., 1994. Constitutive and elicitation induced metabolism of isoflavones and pterocarpan in chickpea (*Cicer arietinum*) cell suspension cultures. In *Primary and Secondary Metabolism of Plants and Cell Cultures III*, (Eds) Springer Netherlands: 199-211.
- Basandrai A. K., Pande S., Kishore G. K., Crouch J. H., Basandrai D., 2005. Cultural, morphological and pathological variation in Indian isolates of *Ascochyta rabiei*, the chickpea blight pathogen. *The Plant Pathology Journal*, 21(3):207-213.
- Bashir N., 1989. *Biochemical basis of resistance in chickpea against Ascochyta blight with special reference to phenolics*. Thèse de Doctorat, Université de Bahauddin Zakarya, Pakistan, 177p.
- Baumgartner A., 1998. La viande des pauvres. *Tabula* , 3:16-19.
- Bavatharine, G., Seran, T., 2013. *In Vitro* Response of Cotyledon Explants of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Cultured in Different Concentrations of BAP. *Journal of Food and Agriculture*, 3:1-2.
- Bayraktar H., Dolar F. S., Maden, S., 2007. Mating type groups of *Ascochyta rabiei* (Teleomorph: *Didymella rabiei*), the causal agent of chickpea blight in Central Anatolia. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31(1): 41-46.
- Bedrani S., 2008. Algérie, l'agriculture, l'agro-alimentaire, la pêche et le développement rural. Monographie CIHEAM, Options Méditerranéennes, série B, 61: 37-73.
- Bellaloui N., Mengistu A., Zobiolo L. H. S., Shier W. T., 2012. Resistance to toxin-mediated fungal infection: role of lignins, isoflavones, other seed phenolics, sugars, and boron in the mechanism of resistance to charcoal rot disease in soybean. *Toxin Reviews*, 31(1-2):16-26.

- Ben Mohamed L., Cherif M., Harrabi M., Galbraight R.F., Strange R., 2010. Effects of sowing date o severity of blight caused by *Ascochyta rabiei* and yield components of five chickpea cultivars grown under two climatic conditions in Tunisia .European journal of plant pathology, 126:293-303.
- Benzohra I. E., Bendahmane B. S., Benkada M. Y., Labdi, M., 2015. Screening of 15 Chickpea Germplasm Accessions for Resistance to *Ascochyta rabiei* in North West of Algeria.. World Journal of Agricultural Sciences American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 15 (1):109-114.
- Berber İ., Önlü H. ,2012. The levels of nitrite and nitrate, proline and protein profiles in tomato plants infected with *Pseudomonas Syringae*. Pakistan Journal of Botany, 44(5):1521-1526.
- Bharathi P., Elavarasi N., 2012. Preliminary studies of reactor system designed for cell suspension culture of chickpea (*Cicer arietinum*). International Journal of Chemical Sciences and Applications, 3(1):223- 231.
- Bhardwaj, R.; Sandhu, J.S.; Kaur, L.; Gupta, S.K.; Gaur, P.M.; Varshney, R.K. , 2010. Genetics of Ascochyta blight resistance in chickpea. Euphytica, 171: 337–343.
- Blount JW, Dixon RA, Paiva NL. Stress response in alfalfa (*Medicago sativa* L.): XVI. Antifungal activity of medicarpin and its biosynthetic precursors: implications for the genetic manipulation of stress metabolites. 1992; 41:333–349.
- Boller T., Felix G., 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. Annual review of Plant Biology, 60: 379-406.
- Bolton, M. D. (2009). Primary metabolism and plant defense-fuel for the fire. Molecular Plant-Microbe Interactions, 22(5), 487-497.
- Borja I, Sharma P., Krekling T., Lönnerborg A., 1995. Cytopathological response in roots of *Picea abies* seedlings infected with *Pythium dimorphum*. Phytopathology, 85(4):495-501.
- Bouabdallah L., 1986 Culture in vitro du melon (*Cucumis melo* L.) et tentative d'application à l'étude de la fusariose. Thèse de Doctorat Université Paris –sud, 75p.
- Boxus P., Bercetche J., Bollon H., Ducas J.P., Jemmali A., Pâque M., Petlard V. et Pieron S., 1995. Multiplication végétale, micropropagation, embryogenèses somatiques. Eds. Centre National d'enseignement à distance, 37-44.
- Bremer B, Bremer K, Chase M, Fay M, Reveal J, Soltis D, Soltis P and Stevens P, 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Periodical An update of the Angiosperm Phylogeny Group

classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society, 161:105–121.

- Broughton WJ, Hernandez G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.). Model food legumes. Plant and Soil, 252(1):55-128.
- Bruns .R et Barz W., 2001. Studies on cell number and nuclei in spores and ploidy level in *Ascochyta rabiei* isolates. J. Phytopathology, 149: 253-258.
- Bruno G., Sparapano L., 2006. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: I. Characterization of secondary metabolites in culture media and host responses to the pathogens in calli. Physiological and Molecular Plant Pathology, 69(4):209-223.
- Buchanan B. B., Gruissem W., Vickers K., Jones R. L., 2015. Biochemistry and molecular biology of plants. (Eds.) John Wiley and Sons, 1280 p.
- Buhtz A., Witzel K., Strehmel N., Ziegler J., Abel S., Grosch, R., 2015. Perturbations in the Primary Metabolism of Tomato and *Arabidopsis thaliana* plants infected with the soil-borne fungus *Verticillium dahliae*. PloS one, 10(9):1-14.

-C-

- Caretto S., Linsalata V., Colella G., Mita, G., Lattanzio V., 2015. Carbon Fluxes between Primary Metabolism and Phenolic Pathway in Plant Tissues under Stress. International journal of molecular sciences, 16(11): 26378-26394.
- Carlile M.J, Watkinson S.C., Gooday G.W., 2001. The fungi. Academic Press, 588 p
- Casares A., Gonzalez A., Sanchez Tains R., 1994. Ultrastructure of calli from resistant and susceptible chestnut inoculated with *Phytophthora cambivora*. Journal of. Physiopathology, 142:19-26.
- Chand R., Sen D., Prasad K. D., Singh A. K., Bashyal B. M., Prasad L. C., Joshi A. K., 2008. Screening for disease resistance in barley cultivars against *Bipolaris sorokiniana* using callus culture method. Indian Journal of Experimental Biology, 46(4):249-253.
- Chandirasikaran R., 2007. Option for reducing *Ascochyta* blight severity in chickpea. Thèse de Master, Université de Saskatchewan, Saskatoon, Canada, 161p.
- Chatterjee A., Ghosh S. K., 2008. Alterations in biochemical components in mesta plants infected with yellow vein mosaic disease. Brazilian Journal of Plant Physiology, 20(4):267-275.
- Chen, Y. M., Strange, R. N., 1994. Production of a proteinaceous phytotoxin by *Ascochyta rabiei* grown in expressed chickpea sap. Plant pathology, 43(2):321-327.

- Chongo G., Gossen B.D., Buchwaldt L, Adhikari T et Rimmer S.R., 2004. Genetic Diversity of *Ascochyta rabiei* in Canada. *Plant Disease*, 88(1):4-10.
- Clériveret A., Alami I., Breton F., Garcia D., Sanier C., 1996. Les composés phénoliques et la résistance des plantes aux agents pathogènes. *Acta Botanica Gallica*, 143(6):531-538.
- Colodete C. M., Ruas K. F., de Oliveira Barbirato J., Barroso A. L. P., Dobbss L. B., 2015. Biochemistry characterization of proteins defense against oxidative stress in plants and their biosynthetic pathways of secondary metabolites, oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57(3):449-459.
- Conceição L. F., Ferreres F., Tavares R. M., Dias A. C., 2006. Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. *Phytochemistry*, 67(2) :149-155.
- Couée I., Sulmon C., Gouesbet G., El Amrani A., 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*, 57(3):449-459.
- Crino P., 1990. Chickpea breeding for resistance to *Ascochyta* blight. *CIHEAM, Options méditerranéennes*, 9: 55-59.

-D-

- Dai G.H., Andary C., Mandolot-Cosson L., Boubals D., 1995. Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). *European Journal of Plant Pathology*, 101: 541-547.
- Daniel S., Hinderer W., Barz W., 1988. Elicitor-induced changes of enzyme activities related to isoflavone and pterocarpan accumulation in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 43(7-8):536-544.
- Daniel S., Tiemann K., Wittkamp U., Bless W, Hinderer Walter, Barz W.1990 Elicitor-induced metabolic changes in cell cultures of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars resistant and susceptible to *Ascochyta rabiei*. *Planta*, 182:270-278.
- Datta, J. and N. Lal. 2012. Temporal and spatial changes in phenolic compounds in response Fusarium wilt in chickpea and pigeonpea. *Cellular and Molecular Biology* 58(1):96-102.
- Davar R., Darvishzadeh R., Ahmad M. A. J. D., 2012. *Sclerotinia*-Induced Accumulation of Protein in the Basal Stem of Resistant and Susceptible Lines of Sunflower. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(1):119-124.
- David J., Khan K., 2001. Effect of nitrogen application on nodulation in inoculated chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Biological Sciences* 1(3): 87-89.

- Davidson J.A., Kimber R. B .E., 2007. Integrated disease management of *Ascochyta* blight in pulse crops. *European Journal of Plant Pathology*, 119:99–110.
- Dey S.K., Singh G., 1994. Seedborne infection of *Ascochyta rabiei* in chickpea and its transmission to aerial plant parts. *Phytoparasitica*, 22 (1): 31-37.
- Dickinson M., 2003. *Molecular plant pathology*. BIOS Scientific Publishers, 273p.
- Dita M.A, Rispaïl N., Prats E., Rubiales D.et Singh K.B, 2006. Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in Legumes. *Euphytica*, 147:1-24.
- Doke N., Tomiyama K., 1980. Suppression of the hypersensitive response of potato tuber protoplasts to hyphal wall components by water soluble glucans isolated from *Phytophthora infestans*. *Physiological Plant Pathology*, 16(2):177-186.
- Dokken-Bouchard F., Miller S., McCall P., McVicar R., 2010. *Scouting and Management of Ascochyta Blight in Chickpea*, Saskatchewan Ministry of Agriculture, 24p.
- Dubois J., 1989. *Biotechnologie et amélioration. Plantes vivrières tropicales*. Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, 19-25.
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers, P., Smith F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3):350-356.
- Dugan F.M., Lupien S. L., Hernandez-Bello M., Peever T. L., Chen W., 2005 Fungi resident in chickpea debris and their suppression of growth and reproduction of *Didymella rabiei* under laboratory conditions. *Journal of Phytopathology*, 153:431-439.
- Duhoux E., Nicole Michel, Selosse M.A. 2004. *Biologie végétale: associations et interactions chez les plantes : premier cycle, prépas, CAPES, Pharmacie*. Paris: Dunod, 166p.
- Dussert S., Verdeil J.L., Buffard-Morel J., 1995. Specific nutrient uptake during initiation of somatic embryogenesis in coconut calluses. *Plant Science*, 11(1): 229-236.
- Durzan D., Chalupa V., Mia A., 1976. Growth and metabolism of cells and tissues of jack pine (*Pinus banksiana*). 1. The establishment and some characteristics of a proliferated callus from jack pine seedlings. *Canadian Journal of Botany*, 54(5-6): 437-445.
- Dusunceli F., Meyveci K., Cetin L., Avci M., Surek D., Albustan S Mert., Z., Akan K., Karacam M., Strange R., 2007. Determination of agronomic practices for the management of blight of chickpea caused by *Ascochyta rabiei* in Turkey: 1. appropriate sowing date. *European Journal of Plant Pathology*, 119(4): 449-456.

-E-

- Esfahani M. N., Sulieman S., Schulze J., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Tran L.P., 2014. Mechanisms of physiological adjustment of N<sub>2</sub> fixation in *Cicer arietinum* L.(chickpea) during early stages of water deficit: single or multi-factor controls. *Plant Journal*, 79(6): 964-980.

-F-

- FAO, Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, 2015. (page consultée le 31 nov 2015) <http://faostat3.fao.org/>
- Fisher C, Porta-Puglia A, Barz W., 1995. RAPD analysis of pathogenic variability in *Ascochyta rabiei*. *Journal of Phytopathology*, 143:604–607.
- Fletcher, E. K Amoako., T. N., Twumasi P., 2011. Effect of 2, 4-D, explants type and cultivar on the callogenesis expression of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Ghana. *African Journal of Biotechnology*, 10(46): 9396-9401.
- Fondevilla S., Krezdorn N., Rotter B., Kahl G., Winter P. 2015. *In planta* identification of putative pathogenicity factors from the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei* by *de novo* transcriptome sequencing using RNA-Seq and massive analysis of cDNA ends. *Frontiers in microbiology*, 6.
- Fosket D.E., Torrey J.G., 1969. Hormonal Control of Cell Proliferation and Xylem Differentiation in Cultured Tissues of *Glycine max* var. Biloxi. *Plant Physiology*. 1969; 44(6):871-880.

-G-

- Gabler F. M., Smilanick J.L., Mansour M., Ramming D.W., Makey B. E., 2003. Correlations of Morphological, Anatomical, and Chemical Features of Grape Berries with Resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 93(10):1263-1273.
- Gallão M. I., Cortelazzo A. L., Fevereiro M. P.S., Brito E.S., 2007. Response to chitin in suspension-cultured *Citrus aurantium* cells. *Brazilian journal of plant physiology*, 19(1): 69-76.
- Gamliel-Atinsky E., Shtienberg D., Vintal H., Nitzni Y., Dinour A., 2005. Production of *Didymella rabiei* pseudothecia and Dispersal of ascospores in a Mediterranean Climate. *Phytopathology*, 95 (11): 1279-1286.
- Gan Y.T., Siddique K.H.M, MacLeod W.J. et Jayakumar P., 2006. Management options for minimizing the damage by *Ascochyta* blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crops Research*, 97:121–134.

- Gandonou C., T. Errabii J. Abrini M. Idaomar F., Chibi, Senhaji S., 2005. Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum* sp.). *African Journal of Biotechnology*, 4(11): 1250-1255.
- Garcia-Brügger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., Pugin A., 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 19:711–724.
- Gautheret R. J., 1959. *La culture des tissus végétaux: techniques et réalisations*. Masson (Eds.) 863p.
- Goicoechea N., Aguirreolea J., Cenoz S., Garcia-Mina J. M., 2000. *Verticillium dahliae* modifies the concentrations of proline, soluble sugars, starch, soluble protein and abscisic acid in pepper plants. *European Journal of Plant Pathology*, 106(1):19-25.
- Gopitha, K., Bhavani, A. L., Senthilmanickam, J., 2010. Effect of the different auxins and cytokinins in callus induction, shoot, root regeneration in sugarcane. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*, 1(3):1-7.
- Goyal B.K., Kant U., Verma P.R., 1995. Growth of *Albugo candida* (race unidentified) on *Brassica juncea* callus cultures. *Plant and Soil*, 172: 331-337.
- Graham TL., 1995. Cellular biochemistry of phenylpropanoid responses of soybean to infection by *Phytophthora sojae*. In: Daniel M, Purkayastha RP, editors. *Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action*. New York: Marcel Dekker: 85–116.
- Gueye B., Morcillo F., Collin M., Gargani D., Overvoorde P., Aberlenc-Bertossi F Verdeil, J. L., 2009. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2, 4-D treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99(1):35-45.
- Guignard J.L.; Dupont F., 2004. *Botanique Systématique moléculaire*. 13 Edition révisée Masson Paris, 284p.
- Guleria S., Kumar A., 2006. Antifungal activity of some Himalayan medicinal plants using direct bioautography. *Journal of cell and molecular Biology*, 5: 95-98.
- Gupta S., Nadarajan N., Gupta D. S., 2014. *Legumes in the Omic Era*, Springer-Verlag New York, 348p.
- Gustine D. L., Sherwood R. T, Vance C. P., 1978. Regulation of Phytoalexin Synthesis in Jackbean Callus Cultures. *Plant Physiology*, 61:226-230.

-H-

- Haggag W.M., 2008. Biotechnological aspects of plant resistant for fungal diseases management. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 2(1):1-18.

- Hamid N., Rehman A., Kanwal B., 2014. Biochemical response of *Glycine max* after inoculation of different concentrations of *Fusarium solani*. Pakistan Journal of Chemistry, (4):92-95.
- Hammerschmidt R., 1999. Phytoalexins: what have we learned after 60 years?. Annual Review of Phytopathology, 37(1):285-306.
- Hannan, R., Açıkgöz N., Robertson L. D., 2001. Chickpeas (*Cicer L.*). Plant genetic resources of legumes in the Mediterranean, Springer: 115-124.
- Harborne A., 1998. Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis, Springer Science & Business Media, 302 p.
- Harijati N., Keane P. J., 2012. Disease Development Caused by *Ascochyta rabiei* on Chickpea Detached-Leaves in Petri Dishes, American Journal of Plant Sciences, 3(10): 1369-1375.
- Hartman C. L., McCoy T.J., Knous T.R., 1984. Selection of Alfalfa (*Medicago sativa*) cell lines and regeneration of plants resistant to the toxin(s) produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicagenis*. Plant Science Letters, 34:183-194.
- Heuberger A. L., Robison F. M., Lyons S. M. ABroeckling., C. D., Prenni J. E., 2014. Evaluating plant immunity using mass spectrometry-based metabolomics workflows. Frontiers in plant science, 5:1-11.
- Höhl B., Arnemann M., Schwenen L., Stöckl D., Bringmann G., Jansen J., Barz W., 1989. Degradation of the Pterocarpan Phytoalexin (—)-Maackiain by *Ascochyta rabiei*. Zeitschrift für Naturforschung C, 44(9-10), 771-776.
- Höhl B., Pfautsch M., Barz W., 1990. Histology of disease development in resistant and susceptible cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) inoculated with spores of *Ascochyta rabiei*. Journal of Phytopathology, 129: 31-45.
- Holliday, M., Klarman W., 1979. Expression of disease reaction types in soybean callus from resistant and susceptible plants. Phytopathology, 69: 576-578.
- Homans, A. L. and Fuchs, A., 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. Journal of Chromatography, 51:327-329.
- Hopkins W. G., 2003. Physiologie végétale. De Boeck Supérieur, 532p.
- Huang J. S., 2013. Plant Pathogenesis and resistance: biochemistry and physiology of plant-microbe interactions. Springer Science and Business Media, 692 p.
- Hüchelhoven R., 2007. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. Annual Review of Phytopathology, 45:101-127.

- Huda S., Siddique N. A., Khatun N., Rahman M. H., Morshed M., 2003. Regeneration of shoot from cotyledon derived callus of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Pakistan Journal of Biological Sciences, 6 (15):1310-1313.

- Huda, S., Islam, R., & Bari, M. A., 2000. Shoot regeneration from internode derived callus of chickpea (*Cicer arietinum* L.). International Chickpea and Pigeonpea Newsletter, (7):28-29.

-I-

- Ighilhariz Z., 2008 Contribution à la valorisation d'*Atriplex halimus* L. et *Atriplex canescens* Pursh Nutt. par la culture de tissus *in vitro*. Thèse de Doctorat Université d'Oran, Algérie, 143 p.

- Indhumathi T, Mohandass Dr. S., 2013I. Identification of bioactive compounds in *Solanum incanum* fruit by Thin layer Chromatography and HPTLC International Journal of Scientific Research, 2(6):22-25.

- Ingram D.S., 1967. The expression of R-gene Resistance to *Phytophthora infestans* in Tissue Cultures of *Solanum tuberosum*. Journal of general microbiology, 49(1):99-108.

- Ingram D. S., Joachim, I., 1971. The growth of *Peronospora farinosa* f. sp. *betae* and sugar beet callus tissues in dual culture. Microbiology, 69(2): 211-220.

- Iqbal S.M., Ghafoor A., 2005. Identification of blight resistant genotypes from local and exotic chickpea. Genetic resources Pakistan Journal of Botany., 37(1):79-86.

- Iqbal S.M., Ghafoor A., Ayub N., Ahmad Z., 2004. Pathogenic diversity in *Ascochyta rabiei* isolates collected from Pakistan. Pakistan Journal of Botany, 36(2): 429-437.

- Islam R., Farooqui H., Raizuddin S., 1998. In vitro genotype phytohormone interaction in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Tissue Culture, 8(1): 173-175.

-J-

- Jabeen K., Javaid A., Ahmed E., Athar M., 2010. Antifungal compounds from *Melia azedarach* leaves for management of *Ascochyta rabiei*, the cause of chickpea blight. Natural Product Research, 12:1-13.

- Jacobi W.R., Amerson H.V., Mott R. L., 1982. Microscopy of cultured loblolly pine seedlings and callus inoculated with *Cronartium fusiforme*. Phytopathology, 72(1):138-143.

- Jaiswal P., Cheruku J. R., Kumar K., Yadav S. Singh A., Kumari P., Dube S. C., Upadhyaya K. C., Verma P. K., 2012. Differential transcript accumulation in chickpea during early phases of compatible interaction with a necrotrophic fungus *Ascochyta rabiei*. Molecular Biology Reports, 39(4): 4635-4646.

- Jamil F. F., Sarwar M., Sarwar N., Khan J. A., Zahid M. H., Yousaf S., Haq I., 2010. Genotyping with RAPD markers resolves pathotype diversity in the Ascochyta blight and Fusarium wilt pathogens of chickpea in Pakistan. Pakistan Journal of Botany, 42(2):1369-1378.
- Jang J.C., Tainter F.H., 1990 (a). Cellular response of Pine callus to infection by *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology, 80(12):1347-1352.
- Jang J.C., Tainter F.H., 1990 (b). Hyphal Hyphal growth of *Phytophthora cinnamomi* on pine callus tissue Plant Cell Reports, 8:741-744
- Jayakumar P., Gan Y., Gossen B., Warkentin T., Banniza S., 2005. Ascochyta blight of chickpea: infection and host resistance mechanisms. Periodical Ascochyta blight of chickpea. Canadian Journal of Plant Pathology, 27:499–509.
- Jimenez –Gonzalez L. Alvarez-Corral M., Munoz-Dorado M. et Rodriguez-Garcia I., 2008. Pterocarpan: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. Phytochemistry Review, 7: 125-154.
- Jones B., Ljung K., 2011. Auxin and cytokinin regulate each other's levels via metabolic feedback loop. Plant Signaling and Behavior, 6(6):901-904.
- Jones J. D., Dangl J. L., 2006. The plant immune system. Nature, 444 (7117): 323-329.
- Jukanti A., Gaur C, Gowda, Chibbar R., 2012. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. British Journal of Nutrition, 108 (1): 11-26.

-K-

- Kadiri A., Ighilhariz Z., Bouabdallah L., Benbayer Z., 2012. Étude histocytochimique des cals de *Cicer arietinum* L. confrontés au mycélium d'*Ascochyta rabiei*. Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie, 25(1): 32-40.
- Kadiri A., Ighilhariz Z., Bouabdallah L., Benbayer Z., 2013. Explant source, genotype and plant growth regulators effects on chickpea (*Cicer arietinum* L.) callus induction. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 5(10): 1067-1073.
- Kadiri A., Ighilhariz Z., Bouabdallah L. et Halfaoui Y., 2014. Influence du génotype, du type d'explant et de la balance hormonale sur la callogenèse chez le pois chiche (*Cicer arietinum* L.). Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques, 11: 59 à 66.
- Kaiser W.J, Küsmenoglu L., 1997. Distribution of mating types and the teleomorphe of *Ascochyta rabiei* on chickpea in Turkey. Plant Disease, 81(11):1284-1287.
- Kaiser, W. J. (1997). Inter-and intranational spread of ascochyta pathogens of chickpea, faba bean, and lentil. Canadian Journal of Plant Pathology, 19 (2), 215-224.

- Kavousi H. R., Marashi H., Bagheri A., 2009. Expression of phenylpropanoid pathway genes in chickpea defense against race 3 of *Ascochyta rabiei*. plant pathology journal, 8.
- Kerem Z., Lev-Yadun S., Gopher A., Weinberg P., Abbo S., 2007. Chickpea domestication in the Neolithic Levant through the nutritional perspective. Journal of Archaeological Science, 34(8):1289-1293.
- Kessman H. et Barz W., 1987. Accumulation of isovlavone and pterocarpan phytoalexin in cell suspension culture of different cultivars of chickpea. Plant cell report. 6 (1): 55-59.
- Kessmann H., Daniel S., Barz W., 1988 Elicitation of pterocarpan phytoalexins in cell suspension cultures of different chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars by an elicitor from the fungus *Ascochyta rabiei*. Zeitschrift für Naturforschung C, 43: 529-535
- Kessmann H., Edwards R., Geno P.W., Dixon R. A., 1990. Stress Responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). Plant Physiology, 94:227-232.
- Khan I A. Alam S. S., Haq A., Jabbar A., 2005. Biochemistry of resistance in chickpea against wilt disease caused by *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *Ciceris* Pakistan Journal of Botany, 37(1): 97-104
- Khan M.S.A., Ramsey M.D., Corbière R., Infantino A., Porta-Puglia, Bouznad Z., Scott E.S., 1999. *Ascochyta* blight of chickpea in Australia: identification, pathogenicity and mating type. Plant Pathology, (48):230-234.
- Khan S., Ahmad F., Ali F., Khan H., Khan A., Swati Z A., 2011. Callus induction via different growth regulators from cotyledon explants of indigenous chick pea (*Cicer arietinum* L.) cultivars KK-1 and Hassan-2K. African Journal of Biotechnology, 10(40): 7825-7830.
- Kim M., Lim J. H., Ahn C. S., Park K., Kim G. T., Kim W. T., Pai H. S., 2006. Mitochondria-associated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. The Plant Cell, 18(9): 2341-2355.
- Kimurto P K, Towett B, Mulwa R S, Njogu N, Jeptanui L J, Rao G N V P R, Silim S, Kaloki P, Korir P., Macharia J K, 2013. Evaluation of chickpea genotypes for resistance to *Ascochyta* blight (*Ascochyta rabiei*) disease in the dry highlands of Kenya. Phytopathologia Mediterranea, [S.l.], 52(1):212-221.
- Köhler G., Linkert C., Barz W., 1995. Infection studies of *Cicer arietinum* (L.) with gus (*E. coli* beta-glucuronidase) transformed *Ascochyta rabiei* strains. Journal of Phytopathology, 143:589-595.
- Koli S. P., Patil D. A., Patil A. G., Chandra N., 2009. Evaluation of in vitro responses from different explants of *Averrhoa carambola* L. Journal of Cell and Tissue research, 9(2):1839.

- Kosturkova G., Rodeva R., Tasheva K., Dimitrova M., Dimanov D., 2012. Effect of crude culture filtrates of the pathogenic fungus *Phoma medicaginis* on *in vitro* cultures of pea. *Agro Life Scientific Journal*, 1:126-131.
- Kouakou H. T., Kouakou L. K., Kouassi M. K., Koffi E. K., Kone M., 2014. Influence de la taille des vitroplants et du type d'explant sur la réponse à la callogenèse chez le cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) cultivé en Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 8(2):588-595.
- Kraft B., Barz W., 1985. Degradation of the isoflavone biochanin A and its glucoside conjugates by *Ascochyta rabiei*. *Applied and environmental microbiology*, 50(1):45-48.
- Krause C. R., Ichida J. M., Schreiber L. R., Domir S., 1996. Host-parasite relationships of susceptible and resistant elm callus cultures challenged with *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf. *Journal of Environmental Horticulture (USA)*. *Journal of Environmental Horticulture*, 14(1):33-38.
- Kumar P., Kalappanavar I., Arunkumar G., Pradeep P., 2011. Studies on selected physiological and biochemical parameters responsible for resistance to spot blotch of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Wheat Research*, 3(2):36-43.
- Kumar J., Pratap A., Solanki R., Gupta D., Goyal A., Chaturvedi S., Nadarajan N., Kumar S., 2012. Genomic resources for improving food legume crops. *The Journal of Agricultural Science*, 150(03): 289-318.
- Kumar, P., M. Sangwan and N. Mehta. 2010. Callogenic response of calli from chickpea genotypes on exposure to culture filtrate of *Ascochyta rabiei*. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 40(1): 22-26.
- Kumar, P., M. Sangwan, N. Mehta and S. Kumar. 2014. Anti-oxidative enzyme changes associated with chickpea calli tolerant to *Ascochyta rabiei* culture filtrate. *Journal of Environmental Biology*, 35(3): 491.

-L-

- Label K., Handaji N., Brhadda N., Arsalane N., Gmira N., Essalhi E., Aderdour T., Benyahia H., 2015. Optimisation de l'induction de callogenèse à partir des embryons excisés de mandariniers (*Citrus* spp.). *Journal of Applied Biosciences*, 89(1): 8300-8310.
- Latif .Z, 2002. Role of virulence factors in breeding resistance to *Ascochyta rabiei*. Thèse de Doctorat Université du Punjab, Lahore, Pakistan. 136p.
- Latif Z., Strange R., N.Bilton J., Riazuddin S., 1993. Production of the phytotoxins, solanapyrones A and C and cytochalasin D among nine isolates of *Ascochyta rabiei*. *Plant Pathology*, 42:172-180.

- Lattanzio V., Lattanzio V. M., Cardinal A., 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in research*, 661:23-67.
- Lebeda A., Švábová L., 2010. In vitro screening methods for assessing plant disease resistance. In *Mass Screening Techniques for Selecting Crops Resistant to Diseases* International Atomic Energy Agency publications, 327p.
- Lepoivre P., 2003. *Phytopathologie : bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte* Edition De Boek, 427p.
- Leterme P., 2002. Recommendations by health organizations for pulse consumption. *British Journal of Nutrition* 88(S3): 239-242.
- Lewis J A, Papavizas G, 1991. Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow. *Periodical Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow*, 10 (2), 95-105.
- Lherminier J., Benhamou N., Larrue J., Milat M. L., Boudon-Padieu E., Nicole M., Blein J. P., 2003. Cytological characterization of elicitor-induced protection in tobacco plants infected by *Phytophthora parasitica* or phytoplasma. *Phytopathology*, 93(10):1308-1319.
- Lippmann R., Kaspar S., Rutten T., Melzer M., Kumlehn J., Matros A., Mock H. P., 2009. Protein and metabolite analysis reveals permanent induction of stress defense and cell regeneration processes in a tobacco cell suspension culture. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(7):3012-3032.
- Liu J., Sandahl M., Sjöberg P. J., Turner C., 2014. Pressurised hot water extraction in continuous flow mode for thermolabile compounds: extraction of polyphenols in red onions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(2):441-445.
- Longevialle M. 1974. Première description d'un cal se prêtant à la culture indéfinie, obtenu à partir d'une Campanulacée, *Specularia Speculum* L. (DC). *Bulletin de la Société Botanique de France*, 121(3-4): 89-96.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1):265-275.
- Luc M., Sikora R. A., Bridge J., 1990. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, CAB International, 629p.
- Lygin A. V., Li S., Vittal R., Widholm J. M., Hartman G. L., Lozovaya V. V., 2009. The importance of phenolic metabolism to limit the growth of *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopathology*, 99(12):1412-1420.

-M-

- Maatougui E. H., Bouznad Z., Labdi. M., 1996. Chickpea in Algeria. Adaptation of Chickpea in the West Asia and North Africa Region Edited by N P Saxena, M C Saxena, C Johansen, S M Virmani, and H Harris, 262p.
- Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C., 2005 les composés phénoliques des végétaux Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, 192 p.
- Mackenbrock U., Vogelsang R., Barz W., 1992. Isoflavone and pterocarpan malonylglucosides and  $\beta$ -1, 3-glucan-and chitin-hydrolases are vacuolar constituents in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Zeitschrift für Naturforschung C, 47(11-12): 815-822.
- Malhotra R.S., 1983. Plant pathology. Eds. Tata, Mc Graw-Hil L. Publishing company limited, New Delhi, 771p.
- Mansour E. H., 1996. Biological and chemical evaluation of chickpea seed proteins as affected by germination, extraction and  $\alpha$ -amylase treatment. Plant foods for Human Nutrition, 49: 271-282.
- Markell S., Wise K., McKay K., Goswami R., Gutmested N., 2008 Ascochyta blight of chickpea. Plant Disease Management North Dakota State University State Extension Report No. 1362 p.
- Markham, K. R. (1982). Techniques of flavonoid identification Vol. 31. London: Academic press, 354 p
- Mathpal P., Punetha H., Tewari A. K., Agrawal S., 2011. Biochemical defense mechanism in rapeseed-mustard genotypes against *Alternaria* blight disease. Journal of Oilseed Brassica, 2(2):87-94.
- Matyssek R., Schnyder H., Oßwald W., Ernst D., Munch J. C., Pretzsch H., 2014. Growth and defence in plants. Eds. Springer, 470p.
- Maurya S, Singh U, Singh D, Singh K et Srivastava J, 2005.Secondary metabolites of chickpea (*Cicer arietinum*) and their role in pathogenesis after infection by *Sclerotium rolfsii*. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 112(2):118-123.
- McComb J.A, HinchJ; M., Clarke A.E., 1987. Expression of field resistance in callus tissue inoculates with *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology, 77(2) 346-351.
- McPhee K. E., Croser J., Sarmah B., Ali S. S., Amla D. V., Rajesh P. N., Higgins T. J., 2007. Development of transgenics in chickpea. Chickpea breeding and management. CAB International, New Delhi, India, 458-473.

- Mehrotra R., Aggarwal A., 2013. Fundamentals of Plant Pathology, Tata McGraw-Hill Education, 433 p.
- Mel'nik V. A., Braun U., Hagedorn G., 2000. Key to the fungi of genus *Ascochyta* Lib. (Coelomycetes). Kurfustendamm, Berlin, Arno Brynda, Berlin, 192p.
- Mierziak J., Kostyn K., Kulma A., 2014. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19(10):16240-16265.
- Miller S.A., Davidse L.C., Maxwell D.P., 1984. Expression of genetic susceptibility, host resistance, and nonhost resistance in Alfalfa callus tissue inoculated with *Phytophthora megasperma*. *Phytopathology*, 74(3):345-348.
- Mirakabad Z., Bagheri A. R., Mehrjerdi Z., 2010. Efficient protocol for break impasses of regeneration via callus for 20 genotypes of chickpea. *International Journal of Plant Production*, 4(2): 117-130.
- Misra R. S., Sharma K., Mishra A. K., Sriram S., 2008. Biochemical alterations induced in Taro in response to *Phytophthora colocasiae* infection. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 2(3), 112-121.
- Moghaddam M. R. B., Le Roy K., Xiang L., Rolland F., Van den Ende W., 2010. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS journal*, 277(9):2022-2037.
- Moghaddam M. R. B., Van den Ende W., 2012. Sugars and plant innate immunity. *Journal of experimental botany. Journal of Experimental Botany*, 1-10
- Mohebodini M, Javaran M J, Mahboudi F and Alizadeh H, 2011. Effects of genotype, explant age and growth regulators on callus induction and direct shoot regeneration of Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Periodical Effects of genotype, explant age and growth regulators on callus induction and direct shoot regeneration of Lettuce (Lactuca sativa L.)*, 5 (1), 92-95.
- Morjane, H., M. Harrabi, 1993. Effect of growth regulators on callus initiation in chickpea. *International Chickpea News Letter*, 28: 22–23.
- Morkunas I., Ratajczak L., 2014. The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(7):1607-1619.
- Morpurgo R., Lopato S. V., Afza R., Novak F. J., 1994. Selection parameters for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 and race 4 on diploid banana (*Musa acuminata* Colla). *Euphytica*, 75(1-2), 121-129.
- Muehlbauer, F. J. and W. Chen. 2007. Resistance to ascochyta blights of cool season food legumes. *European Journal of Plant Pathology*, 119(1): 135-141.

- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 443-497.
- Muria-Gonzalez M. J., Chooi Y. H., Breen S., Solomon P. S., 2015. The past, present and future of secondary metabolite research in the Dothideomycetes. *Molecular plant pathology*, 16(1):92-107.

-N-

- Nafees A., Iqbal J., Salih Ahmed M., 1999. Tissue culture of microsperma lentis (*Lens culinaris* medik) cv.massoor-85. *Pakistan Journal of Botany*. 31(2):283-292.
- Narayanasamy, P., 2001. Plant pathogen detection and disease diagnosis. CRC Press, 544p.
- Navas-Cortes J.A, Trapero-Casas A., Jimenez-Diaz R.M., 1995. Survival of *Didymella rabiei* in chickpea straw debris in Spain. *Plant Pathology*, 44:332-339.
- Navas-Cortes J.A, Trapero-Casas A.et Jimenez-Diaz R.M., 1998. Influence of relative humidity and temperature on development of *Didymella rabiei* on chickpea debris. *Plant pathology*, 47:57-66.
- Naz S., Ali A.et Iqbal J., 2008 (a).phenolic content in vitro cultures Of chickpea (*Cicer arietinum* L.) during callogenesis and organogenesis. *Pakistan Journal of Botany*, 40(6): 2525-2539.
- Naz S., Ali A., Ahmed Siddique F., Iqbal J., 2008 (b). Somatic embryogenesis from immature cotyledons and leaf calli of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Pakistan Journal of Botany* 48 (2):523-531.
- Nehra K. S., Chugh L. K., Dhillon S., Singh R., 1994. Induction, purification and characterization of chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.) leaves and pods infected with *Ascochyta rabiei*. *Journal of plant physiology*, 144(1):7-11.
- Nene Y. L., Reddy M.V.,1987. Chickpea diseases and their control. *In The chickpea*. Saxena M.C. and Singh K.B. (Eds) CAB International Oxan .UK, 233-270
- Neumann K.-H., Kumar A., Imani J., 2009. Plant Cell and Tissue Culture- A Tool in Biotechnology. Basics and Application, Principles and Practice. Springer-Verlag. 333p.
- Nollet L., 2004. Handbook of food analysis: physical characterization and nutrient analysis. Vol. 1. CRC Press, 877 p.
- Nürnberger T., Brunner F., Kemmerling B., Piater L., 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological reviews*, 198(1): 249-266.

-O-

- Oana-Maria I.-B., Florina R., Popescu S., Borozan A., 2011. Regeneration, micropropagation, callus cultures and somatic embryogenesis of common sage (*Salvia officinalis* L.). Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture, 67(1): 308-313.
  - O'Brien, T. P., Feder N., McCully M. E., 1964. Polychromatic staining of Plant cell walls by toluidine blue O. Protoplasma, 59: 367-373.
- P-
- Paiva N. L., Oommen A., Harrison M. J., Dixon Richard A., 1994. Regulation of isoflavonoid metabolism in alfalfa. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 38:213-220.
  - Pande S., Rao J.N., Sharma, M., Pathak M. Stevenson P., 2010(a). Mass-screening techniques for the early selection of disease resistance in chickpea (*Cicer arietinum*). In Mass Screening Techniques for Selecting Crops Resistant to Diseases International Atomic Energy Agency publications, 327p.
  - Pande S., Siddique K. H. M., Kishore G. K., Bayaa B., Gaur P. M., Gowda C. L. L., Crouch J. H., 2005. Ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review of biology, pathogenicity, and disease management. Crop and Pasture Science, 56(4), 317-332.
  - Pande, S., M. Sharma, P.M. Gaur and C.L.L. Gowda. 2010(b). Host Plant Resistance to Ascochyta Blight of Chickpea. Information Bulletin No. 82. Patancheru International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 40p.
  - Pasquier G., 2012). Étude de l'impact de l'Esca sur la qualité des raisins par une approche protéomique. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux Segalen, 178p.
  - Patil L. C., Hanchinal R. R., Lohithaswa H. C., Nadaf H. L., Kalappanavar I. K., Megeri S. N., 2011. Biochemical relationship in resistant and susceptible cultivars of spot blotch infected tetraploid wheat. Karnataka Journal of Agricultural Sciences, 24(4):520-522.
  - Peever T. L., Barve M.P., Stone L.J., W.J. Kaiser, 2007. Evolutionary relationships among Ascochyta species infecting wild and cultivated hosts in the legume tribes Cicereae and Viciae. Mycologia, 99(1):59–77.
  - Peever T. L., Salimath S., Su G., Kaiser J.W. and Muehlbauer F.J., 2004. Historical and contemporary multilocus population structure of *Ascochyta rabiei* (telemorph *Didymella rabiei*) in the Pacific northwest of the United States. Molecular ecology. 13:291-309.
  - Pieters R., Tahiri A., 1986. Methods for screening resistance in chickpea to ascochyta blight. Euphytica, 35:1007-1010.
  - Pijut P.M., Domir S.C., Lineberger R.D., Shreiber L. R., 1990. Use of culture filtrates of *Ceratocystis ulmi* as a bioassay to screen for disease tolerant *Ulmus americana*. Plant Science, 70:191-196.

- Poorni K. E., Manikandan A., Geethanjali S., 2011. In vitro callus induction and detection of molecular variation (RAPD analysis) in *Cicer arietinum* L. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 7(1) 79-82.
- Porta-Puglia A., 1990. Statut of *Ascochyta rabiei* of chickpea in the Mediterranean basin. CIHEAM, Options Méditerranéennes, 9:51-54.
- Pothier J., 1996. Thin layer chromatography in plant sciences. book Practical thin layer Chromatography a multidisciplinary Approach by Fried, B., Sherma, J: 33-50.
- Prabhu M. S. C., Safeeulla K. M., Shetty H. S., 1983. Penetration and establishment of downy mildew mycelium in sorghum seeds and its transmission. Proceedings of the Indian National Science Academy, Part B, 49:459-465.
- Pratap A., Kumar J, 2011. Biology and breeding of food legumes. , Centre for Agriculture and Biosciences International, 432p.

-Q-

- Quezel P., Santa, S., 1962. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. Tome I, 565p.

-R-

- Rafiul islam A. K. M., 1991. In vitro organogenesis of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its transformation by *Agrobacterium*. Thèse de Doctorat, Université du Punjab, Lahore, Pakistan, 217 p.
- Rajab R., Rajan S. S., Satheesh L. S., Harish S. R., Sunukumar S. S., Sandeep B. S., Murugan K., 2009. Hypersensitive response of *Sesamum prostratum* Retz. elicited by *Fusarium oxysporum* fsp. *sesame* (Schelt) Jacz Butler. Indian Journal of Experimental Biology, 47(10):834-838.
- Rajakumar E., Aggarwal R., Singh B., 2005. Fungal Antagonists for the biological control of *Ascochyta* blight of chickpea. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungaria, 40(1-2):35-42.
- Ramalho Ribeiro J.M.C. et Portugal Melo I.M., 1990. Composition and nutritive value of chickpea. CIHEAM, Options Méditerranéennes, 9:107-111.
- Rao B. G., Chopra V. L., 1987. Genotypic and explants differences in callus initiation and maintenance in chickpea. International Chickpea Newsletter, 17:10-12.
- Rashid U., Ali S., Ali G. M., Ayub N., Masood M. S., 2009. Establishment of an efficient callus induction and plant regeneration system in Pakistani wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. Electronic Journal of Biotechnology, 12(3): 4-5.

- Rasmussen M. W., Roux M., Petersen M., Mundy J., 2011. MAP Kinase Cascades in *Arabidopsis* Innate Immunity. *Frontiers in plant science*, 3:1-6.
- Rea G., Metoui O., Infantino A., Federico R., Angelini R., 2002. Copper amine oxidase expression in defense responses to wounding and *Ascochyta rabiei* invasion. *Plant Physiology*, 128(3):865-875.
- Redden R., Berger J., 2007. 1 History and Origin of Chickpea. Chickpea breeding and management, Centre for Agriculture and Biosciences International, 638 p
- Reddy M.V., Singh K.B., 1990. Relationship between *Ascochyta* blight severity and yield loss in Chickpea and identification of resistant lines. *Phytopathologia Mediterranea*, 29(1): 32-38.
- Rhaiem A., Chérif M., Harrabi M. First Report of *Didymella rabiei* on Chickpea Debris in Tunisia. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 1:13-18.
- Riazuddin S., Husnain T., Malik T., Farooqi H., Abbar S. T., 1988. Establishment of callus-tissue culture and the induction of organogenesis in chickpea. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 9(3):339-345.
- Ricroch A., Chopra S., Fleischer S., 2014. *Plant Biotechnology: Experience and Future Prospects*. Eds. Springer, 291p.
- Rojas C. M., Senthil-Kumar M., Tzin V., Mysore K. S., 2014. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontier in Plant Science*, 5(17): 1-14.
- Rouxel T., 1989. Les phytoalexines et leur intervention dans la résistance hypersensible aux champignons phytopathogènes. *Agronomie, EDP Sciences* 9 (6):529-545.

-S-

- Sacristán M. D., 1982. Resistance responses to *Phoma lingam* of plants regenerated from selected cell and embryogenic cultures of haploid *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 61(3):193-200.
- Sagare A. P., Suhasini K., Krishnamurthy K.V., 1993. Plant regeneration via somatic embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Cell Reports*, 12:652-655.
- Sakpere A., Ajayi S., Adelusi A., 2014. Effect of growth regulators and explant types on callus induction in *Telfairia occidentalis* hook F. *African Journal of Biotechnology*, 13(20): 2015.
- Sané D., Aberlanc- Bertossi F., Diatta L. I. D., Guèye B., Daher A., Sagna M., Bogel A., 2012. Influence of growth regulators on callogenesis and somatic embryo development in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) sahalian cultivars. *The Scientific World Journal*, 1-8.

- Sani L., Mustapha Y., 2010. Effect of genotype and 2, 4- D concentration on callogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). Bayero Journal of Pure and Applied Sciences, 3(1): 238 - 240
- Sant V J, 2001. Genetic diversity and linkage analysis in chickpea using DNA markers. Thèse de Doctorat. University of Pune Inde, 106 p.
- Sarker R., Ferdous T., Hoque. M., 2005. *In vitro* direct regeneration of three indigenous chickpea (*Cicer arietinum* L.) varieties of Bangladesh. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 15(2): 135-144.
- Sarwar N. I. G. H. A. T., Jamil F. F., Parveen R., 2001. Accumulation of phytoalexins and phenylalanine ammonia lyase in chickpea after inoculation with *Ascochyta rabiei* and their role in defence mechanism. Pakistan Journal of Botany, 33(4):373-382.
- Savita V., G. Virk, Nagpal A., 2010. Effect of explant type and different plant growth regulators on callus induction and plantlet regeneration in *Citrus jambhiri* Lush. Environment and We An International Journal of Science and Technology: 5:97-106.
- Saxena M. C., Singh K., 1984. Ascochyta blight and winter sowing of chickpeas. Martinus Nijhoff/ Dr W. Junk Publishers and ICARDA, The Hague, Netherlands, 288 p.
- Saxena, M.C., 1990. Status of chickpea in Mediterranean basin. CIHEAM, Options Méditerranéennes, 9:17-24.
- Scarpari L. M., Meinhardt L. W., Mazzafera P., Pomella A. W. V., Schiavinato M. A., Cascardo J. C. M., Pereira G. A. G., 2005. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. Journal of Experimental Botany, 56 (413):865-877.
- Seigler, D. S., 2012. Plant secondary metabolism. Springer Science and Business Media, 759 p
- Shafique S., Shafique S., 2008. Antifungal activity of n-hexane extracts of *Datura metel* against *Ascochyta rabiei*. Mycopath. 6(1&2): 31-35.
- Shah, T. M., M. Haq, B. Atta, S. Alam and H. Ali. 2005. Evaluation of *Cicer* species for resistance to Ascochyta blight. Pakistan Journal of Botany 37(2): 431-438.
- Shahid A.A., 2004 Production of phytotoxines from *Ascochyta rabiei* and molecular studies of defence genes in blight infected chickpea. Thèse de doctorat université du Punjab, Lahore Pakistan, 121 p.
- Sharma M., Ghosh R., 2016. An Update on Genetic Resistance of Chickpea to Ascochyta Blight. Agronomy, 6(1), 18.

- Shtienberg D., Gamliel-Atinsky E., Retig B., Brener S., Dinour A., 2005. Significance of preventing primary infections by *Didymella rabiei* and development of a model to estimate the maturity of pseudothecia. *Plant Disease*, 89(10):1027-1034.
- Shtienberg D., Vintal H., Brener S., Retig B., 2000. Rational management of *Didymella rabiei* in chickpea by integration of genotype resistance and post infection application of fungicides. *Phytopathology*, 90: 834–842.
- Singh P., 2000. Permeability Changes and Mineral Metabolism in the Leaves on Onion Infected with *Alternaria porri*. *Advances In Plant Sciences*, 13(1), 323-326.
- Singh M., Singh A., 1992. Growth and sporulation of *Neovossia indica* in wheat callus culture. *Indian Phytopathology*, 45(1):113-115.
- Singh A., Singh N., Gurha S., Asthana A., 1999. In vitro selection against ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 8(2): 117-119.
- Singh F., Diwakar B., 1995. Chickpea botany and production practices. Skill Development Series N°16. ICRISAT, 1-50.
- Singh K.B., Reddy M.V., 1990. Patterns of chickpea resistance and susceptibility to races of *Ascochyta rabiei* among germ plasm accessions and breeding lines of chickpea. *Plant disease*, 74: 127-129.
- Singh K.B., Reddy M.V. et Nene Y. L., 1984. International testing of chickpea for resistance to Ascochyta blight. *Plant Disease*, 68(9):782-784.
- Singh R., Sindhu A., Singal H.R., Singh R., 2003. Biochemical basis of resistance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) against Fusarium wilt. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 38: 13-19.
- Singh, F., Diwakar B., 1995. Chickpea botany and production practices. Skill development series, 16: 8-9.
- Singh, M., Upadhyaya H. D., Bisht I. S., 2013. Genetic and genomic resources of grain legume improvement, Newnes Elsevier, 322 p
- Singh R., Jauhar P., 2005. Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement: Grain Legumes, Volume 1. CRC Press, 390p.
- Singleton V.L., Ross J.A.J., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144–153.
- Slavov S., 2005. Phytotoxines and in vitro screening for improved disease resistant plants. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 19:48-55.

- Sore H., Hilou A., Sombie P. A. E. D., Compaore M., Meda R., Millogo J., Nacoulma O. G., 2012. Phytochemistry and Biological Activities of Extracts from Two Combretaceae Found in Burkina Faso: *Anogeissus Leiocarpus* (DC) Guill. and Perr. And *Combretum Glutinosum* Perr. Ex DC. Universal Journal of Environmental Research and Technology, 2(5): 383-392.
- Strange R., 2003. Introduction to plant pathology. (Eds.) John Wiley & Sons, 480 p.
- Subba Rao P. V., 1987. La rouille de l'arachide: étude de quelques mécanismes de défense de l'hôte. Thèse de Doctorat University De Paris-Sud Centre d'Orsay, 195p.
- Sudha G., Ravishankar G., 2002. Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 71(3):181-212.
- Sujatha, G., N. Jayabalan and B. R. Kumari. 2007. Rapid in vitro micropropagation of *Cicer arietinum* L. HortScience. 34(1):1-5.
- Sunitha M, Subramanian R. B, 2014. Biochemical and Enzymatic Response of *Cajanus cajan* Plant Towards the Biotic Stress Induced by *Fusarium oxysporum udum*. African Journal of Basic and Applied Sciences,6(3): 65-75.
- Svabova L., Lebeda A., 2005. In vitro Selection for Improved Plant Resistance to Toxin-Producing Pathogens. Journal of Phytopathology, 153(1): 52-64.

-T-

- Tarkowski ŁP, Van den Ende W., 2015. Cold tolerance triggered by soluble sugars: a multifaceted countermeasure. Frontiers in Plant Science.;6^:1-7.
- Tawaha, A. R., Turk M. A., Lee K. D., 2005. Adaptation of chickpea to cultural practices in a Mediterranean type environment. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 1:152-157.
- Tivoli B., Benniza S., 2007. Comparison of the epidemiology of *Ascochyta* blights on grain legumes. European Journal of Plant Pathology, 119:59-76.
- Trapero-Casas A., Kaiser W.J., 2009. Alternative hosts and plant tissues for the survival, sporulation and spread of the *Ascochyta* blight pathogen of chickpea. European Journal of Plant Pathology, 125:573–587.
- Trapero-Casas A., navas-Cortes J.A., Jimenez Diaz R., 1996. Airborne ascospores of *Didymella rabiei* as a major primary inoculum for *Ascochyta* blight epidemics in chickpea crops in southern Spain. European Journal of Plant Pathology, 102:237-245.
- Trapero-Casas, A., Kaiser, W. J., 1992. Development of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, on chickpea straw. Phytopathology, 82(11): 1261-1266.

- Trigiano R.N., Van Dyke C.G., Spurr H.W., Gray D.J., 1984. Infection and colonization of Tobacco callus by *Preospora tabacina*. *Phytopathology*, 74(3): 280-285.
- Trigiano, R. N., 2007. *Plant pathology concepts and laboratory exercises*, CRC Press, 576 p.
- Trinidad T. P., Mallillin A. C., Loyola A. S., Sagum R. S. , Encabo R. R., 2010. The potential health benefits of legumes as a good source of dietary fibre. *British Journal of Nutrition*, 103(04): 569-574.
- Trouvelot S., Héloir M. C., Poinssot B., Gauthier A., Paris F., Guillier C., Adrian M., 2014. Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Frontiers in plant science*, 5:1-14.

-U-

- Uchiyama T., Sato J., Ogasawara N., 1983. Lignification and Qualitative Changes of Phenolic Compounds in Rice Callus Tissues. *Agricultural Biological Chemistry*, 47 (1):1-10.
- Upadhyaya G., Shivanna M. B., Prakash H. S., Shetty H. S., 1992. A novel approach to the establishment of dual cultures of pearl millet and *Sclerospora graminicola*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 31(3):203-206.

-V-

- Vail S. L., 2005. Population studies of *Ascochyta rabiei* on chickpea in Saskatchewan. Thèse de Magister. University Of Saskatchewan Saskatoon. 115p.
- Van Loon L. C., Rep M., Pieters C. M. J., 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 135-162.
- Vasil I.K., 2008. A history of plant biotechnology: from the cell theory to Schneiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports*, 27:1423-1440.
- Venora G. et Porta-Puglia A., 1993. Observation of outer layers of stem in chickpea cultivars susceptible and resistant to *Ascochyta* blight. *Petria*, 3:177-182.
- Vidhyasekaran P., 2004 *Concise Encyclopedia of Plant Pathology*. Food Products Press, 619 p.
- Vogelsang R., Berger E., Hagedorn, T., Muhelbauer U., Tenhaken R., Barz W., 1994. Characterization of metabolic changes involved in hypersensitive-like browning reactions of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell cultures following challenge by *Ascochyta rabiei* culture filtrate. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 44: 141-155.

-W-

- Wang, L.F., Wang M., Zhang Y., 2014. Effects of powdery mildew infection on chloroplast and mitochondrial functions in rubber tree. *Tropical Plant Pathology*, **39**(3):242-250.
- Wang X., 2004. Lipid signaling. *Current opinion in plant biology*, 7 (3): 329-336.
- Webster J., Weber R.W.S., 2007. *Introduction to fungi*. Cambridge University Press, 816p.
- Weidemann C.; Tenhaken R. Höhl U., Barz W., 1991. Medicarpin and Maackiain 3-O glucoside -6'-O-malonate conjugates are constitutive compounds in chickpea *Cicer arietinum* L. cell culture. *Plant cell reports*, 10: 371-374.
- Weigand F., Foster J., Weitzien H.C., Barz W., 1986. Accumulation of phytotoxin and isoflavones glucosidases in resistant and susceptible cultivar of *Cicer arietinum* L. during infection with *Ascochyta rabiei*. *Journal of Phytopathology*, 115: 277-282.
- Winch T., 2006. *Growing Food. A Guide to Food Production*. Eds. Springer, 333p.
- Wise K.0251432, Bradley C, Pasche J and Gudmestad N, 2009. Resistance to QoI fungicides in *Ascochyta rabiei* from chickpea in the Northern Great Plains. *Plant Disease*, 93 (5), 528-536.

-Y-

- Yamakawa Y. et LI-Hong Chen, 1992. Selection of 'Koshu' grape resistant to culture filtrate of the pathogenic fungus *Glomerelle cingulata*. *Plant tissue culture letters*, 12(2):197-200.
- Yang D., Bernier L, 1996. Production and use of calli from yellow brich buds for *in vitro* assesment of virulence of *Necteria Galligena* isolates. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45: 175-177.
- Yeung, E. 1998. A beginner's guide to the study of plant structure, 125-142p, *in* Tested studies for laboratory teaching, Volume 19 (S. J. Karcher, Editor). *Proceedings of the 19th Workshop/ Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE)*, 365 p.
- Yu O., Jung, W., Shi J., Croes R. A., Fader G. M., McGonigle B., Odell J. T., 2000. Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. *Plant physiology*, 124(2):781-794.

-Z-

- Zaman M. A., Manjur A. B. M. K., Ahmed M., Islam M. M., 2010. Effect of 2, 4-D on Callus Induction and Subsequent Morphogenesis in Mature Chickpea (*Cicer arietinum* L.).

- Embryo Culture, Proc. Sixth Intl. Plant Tissue Cult. & Biotech. Conf., Bangladesh Assoc. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 53-58.
- Zhang Q., Wang C., Yong D., Li G., Dong X., Li B., 2014. Induction of resistance mediated by an attenuated strain of *Valsa mali* var. *mali* using pathogen-apple callus interaction system. The Scientific World Journal, 1-10.
  - Zhao J., Wang Y., Zhang J., Han Y., Yang Z., Feng W., 2012. Induction of defensive enzymes (isozymes) during defense against two different fungal pathogens in pear calli. African Journal of Biotechnology, 11(72):13670-13677.
  - Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry, 64: 555-559.
  - Zikara-Zine F., 2003. Étude des groupes de conjugaison de 15 isolats algériens d'*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. pour la reproduction sexuée (ou forme parfaite): analyse de la variabilité pathologique de leurs descendants. Thèse de Magister INA El Harrach Alger, 71p.
  - Zipfel C., 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. Current opinion in immunology, 20(1):10-16.
  - Zoeten G.A., Gaad G, Haberlach G.T et Helgeson J. P., 1982. Infection of Tobacco callus by *Phytophthora paraitca* var. *nicotinae*. Phytophology, 72(7):743-746.
  - Zouzou M., Kouakou T. H., Koné, M, Amani N. G., Kouadio Y. J., 2008. Effect of genotype, explants growth regulators and sugars on callus induction in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Australian Journal of Crop Science, 2(1):1-9.
  - Zryd J.P., 1988. Cultures de cellules, tissus et organes végétaux. Fondement théoriques et utilisations pratiques. Presses Polytechniques Romandes, 308p.

# Annexes

---

**1. Milieu pois chiche PC**

Élément	Concentration (g/l)
Farine de pois chiche	50
Glucose	20

pH 5.8

**2. Milieu Murashige et Skoog (1962)**

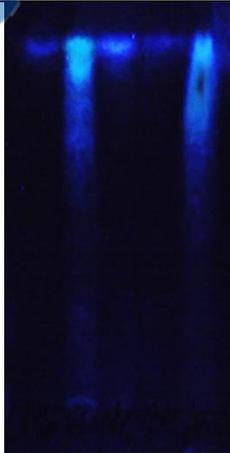
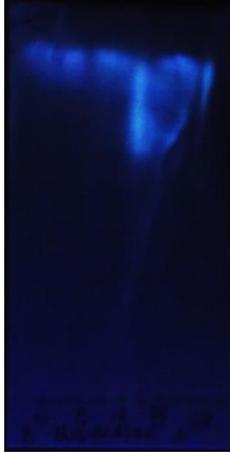
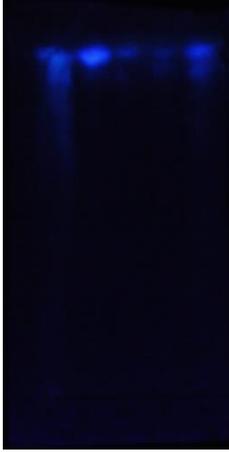
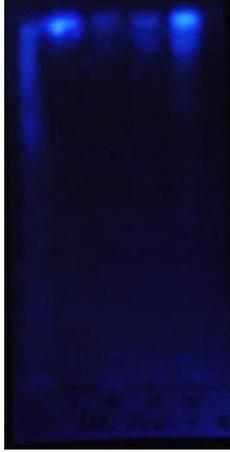
Élément	Concentration (mg/L)
Macroéléments	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
Microéléments	
KI	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
Source de fer	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	37,3
Vitamines	
Myoinositol	100
Acide Nicotinique	0,5
Pyridoxine-HCl	0,5
Thiamine-HCl	0,5
Glycine	2
Source de carbone	
Saccharose	30000

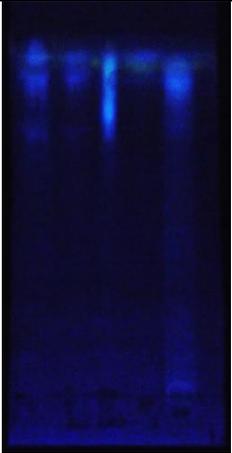
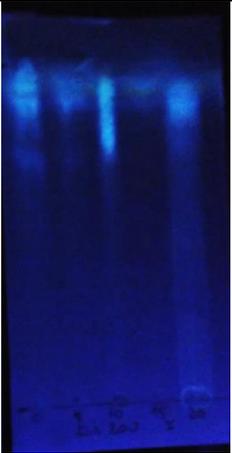
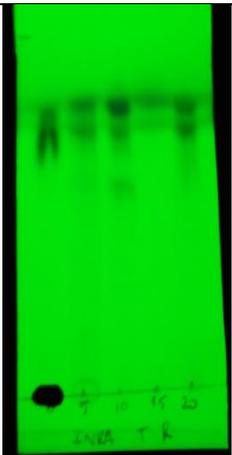
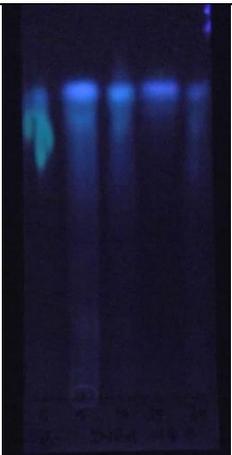
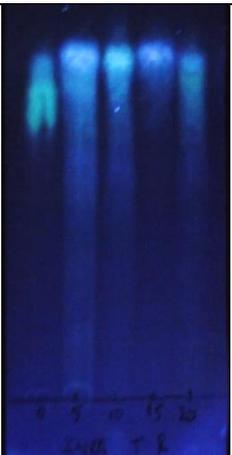
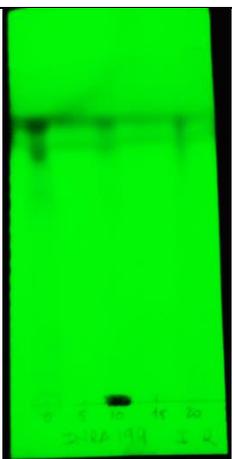
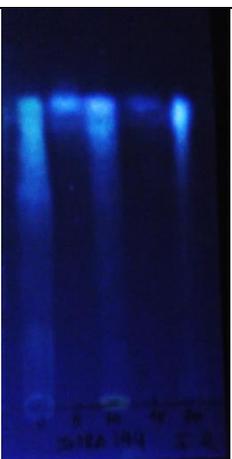
pH 5,8

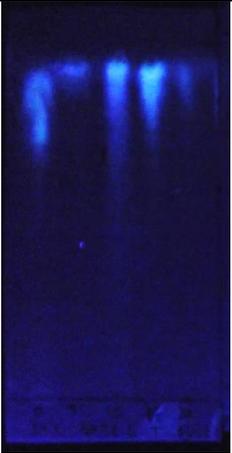
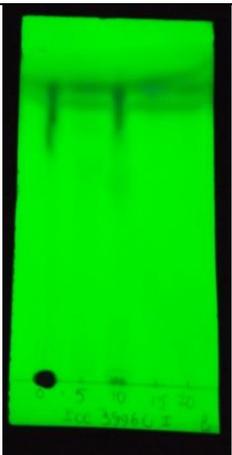
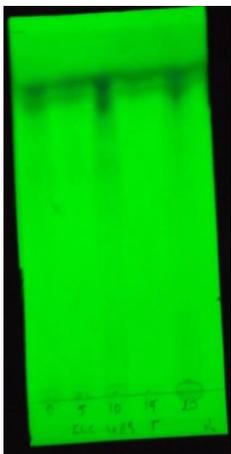
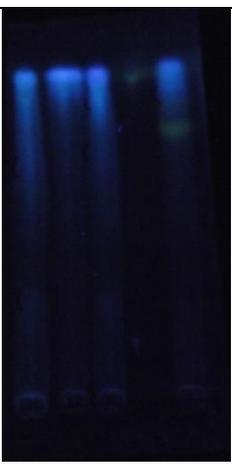
### 3. Milieu pois chiche liquide

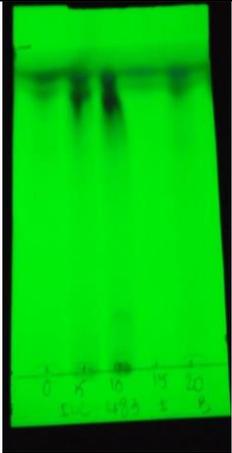
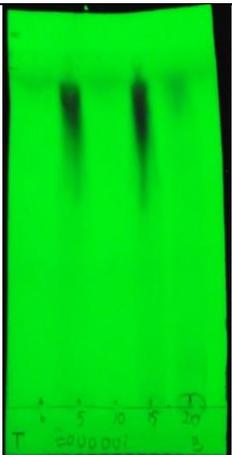
200g de graines de pois chiche commercialisé sont mis à tremper dans 200 ml d'eau distillée pendant 12 heures. Ils sont ensuite bouillis durant 15 mn puis le filtrat est récupéré.

### 4. Chromatogrammes des extraits méthanoliques des cals inoculé (I) et témoins (T) des différents génotypes après migration sur le système éthanol :acide formique :eau (18 :1 :1)

Type de cal	254	365nm	365nm après révélation
Fip 82 150 C T			
Fip 82 150C I			
ILC 200 T			

<p>ILC 200 I</p>			
<p>INRA 199 T</p>			
<p>INRA 199 I</p>			

ICC 3996 C T			
ICC 3996 C I			
ILC 483 T			

<p>ILC 483 I</p>			
<p>Zouaoui T</p>			
<p>Zouaoui I</p>	