

REPUBLIQUE DU CAMEROUN
Paix-Travail-Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDÉ I

ECOLE NORMALE
SUPERIEURE

DÉPARTEMENT DES SCIENCES
BIOLOGIQUES



REPUBLIC OF CAMEROON
Peace-Work-Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

HIGHER TEACHER TRAINING
COLLEGE

DEPARTMENT OF BIOLOGICAL
SCIENCES

**ANALYSE DES POLYSACCHARIDES DE LA PAROI
CELLULAIRE DE *PHYTOPHTHORA MEGAKARYA* ET
PYTHIUM MYRIOTYLUM DEUX OOMYCÈTES
PHYTOPATHOGÈNES DE *THEOBROMA CACAO L.* ET DE
*XANTHOSOMA SAGITTIFOLIUM L. SCHOTT***

Mémoire présenté et soutenu en vue de l'obtention du Diplôme de Professeur de
l'Enseignement Secondaire Deuxième grade (Di.P.E.S. II)

Série: **Biologie**

Par

MANEJIO MBOUDA Chimène Ladouce

Matricule : 04S075

Licence ès science

Option : Biochimie

Sous la direction de

BOUDJEKO Thaddée

Maître de Conférences

Année académique 2015 – 2016

DEDICACE

À MON PÈRE MBOUDA MAURICE ET MA MÈRE FAGOUM CÉSARINE

REMECIEMENTS

Ce travail est le fruit de maints apports tant intellectuels, matériels que financiers de plusieurs personnes. Ainsi je tiens à remercier:

Le Professeur **BOUDJEKO Thaddée** pour l'accueil dans le laboratoire, sa grande disponibilité, et sa volonté à m'inculquer l'esprit de travail et de recherche;

Le Professeur **NIEMENAK N.** pour l'orientation, le choix du laboratoire et les conseils qu'il n'a cessé de m'inculquer en mettant à ma disposition le matériel nécessaire à la réalisation de ce travail ;

Au chef du Centre de Biotechnologie de l'Université de Yaoundé I, le Pr **MBANYA Jean-Claude** qui m'a permis de mener à bien ce travail au sein de son Institution ;

Les **enseignants du Département des sciences biologiques**, en particulier le Chef de Département le Professeur **SONKE Bonaventure** pour leur dévouement et l'esprit de sacrifice dont ils ont fait preuve pour ma formation

Le Docteur **EWANE Cécile Annie** pour son accompagnement et les conseils qu'elle n'a cessé de me prodiguer durant mes travaux de mémoire ;

Les membres du **Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétale de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé I** ; en particulier **Mme DJEUANI Astride Carole et Mme DJABOU MOUAFI Astride Stéphanie** pour leur contributions importantes à la réussite de ce travail;

Mes **camarades du Laboratoire de Phytoprotection et de Valorisation des Ressources Végétales (LPVRV)** du Centre de Biotechnologie de Yaoundé-Nkolbisson; plus particulièrement, **Mr TENE TAYO Paul Martial, Mr MOUAFO TCHINDA Romaric, Mr SIPPING Marius, Mlle DJUIDJE Péguy et Mlle KANEMOTO Emery** pour leurs apports multiples et divers;

Mes camarades de la 55^{ème} promotion, de la filière Biologie; principalement **MEKUE NOUWEZEM Quisselle, NGOULA MEGUASSU Katy Laure et GUIANENG TAGNE Judith** pour leur soutien moral durant cette formation;

Le Docteur **RIHOUEZ Christophe** du Laboratoire de Glycobiologie et de la Matrice Extracellulaire Végétale (GLYCO-MEV) de l'Université de Rouen pour son aide scientifique dans l'analyse des échantillons;

Mes frères **MOUAFO, DJOUSSE, KAMEGNI** mes sœurs **WOUAZE, MANTHO** pour leurs conseils et l'amour dont ils me portent au quotidien ;

Mon fiancé **NOUTCHEHAME Simplicie Emmanuel** pour son encouragement, ses conseils et pour l'amour dont il me comble chaque jour;

Ma belle-sœur **KAMGANG Vivette** pour son soutien moral et psychologique.

Mon oncle **SOB Emmanuel**, mes tantes **NZOFOU Micheline, MANE Sidonie** pour leur conseil et leur soutien au quotidien.

TABLE DE MATIÈRE

DEDICACE	i
REMECIEMENTS	ii
TABLE DE MATIÈRE	iii
ABSTRACT	vi
LISTE DES ABREVIATIONS	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	x
INTRODUCTION	2
CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTERATURE	4
I-1 Généralités sur la paroi cellulaire des champignons et des oomycètes	5
I-1-1 Rôles et fonctions de la paroi cellulaire	5
I-1-2 Composition de la paroi cellulaire des oomycètes et des champignons	6
I-1-2-1 La chitine (β -(1,4)-N-acétylglucosamine)	7
I-1-2-2 La cellulose	9
I-1-2-3 Les autres polysaccharides pariétaux	10
I-1-2-4 Les protéines pariétales.....	11
I-1-2-4-1 Les protéines structurales	12
I-1-2-4-2 Les protéines Enzymatiques	13
I-2 Généralités sur les oomycètes	15
I-2-1 Biologie des Oomycètes.....	16
I-2-2 Phylogénie et classification des oomycètes	18
I-3 Généralité sur l'espèce <i>Phytophthora megakarya</i>	19
I-3-1 Biologie de <i>Phytophthora megakarya</i>	20
I-3-2 Taxonomie et distribution de <i>Phytophthora megakarya</i>	21
I-3-3 Interaction <i>Phytophthora-Theobroma cacao L.</i>	23

I-4 Généralités sur <i>Pythium myriotylum</i>	24
I-4-1 Biologie de <i>Pythium myriotylum</i>	24
I-4-2- Taxonomie et distribution de <i>Pythium myriotylum</i>	26
I-4-3- Interaction <i>Xanthosoma sagittifolium</i> - <i>Pythium myriotylum</i>	27
CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES	30
II-1 Matériel fongique	31
II-2- Culture fongique	31
II-3- Extraction et isolement de la paroi totale	32
II-3-1- Fractionnement de la paroi total	33
II-3-2- Composition monosaccharidique des fractions (AIS, ALS et ALI) de <i>Phytophthora megakarya</i> et <i>Pythium myriotylum</i>	35
II-3-3 Analyses statistiques.....	38
CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION	39
III-1 RESULTATS.....	40
III-1-1 Culture fongique et collecte des masses mycélares	40
III-1-2 Rendement d'extraction et fractionnement de la paroi cellulaire fongique	41
III-1-2-1 Paroi totale (AIS)	41
III-1-2-2 Fraction soluble en milieu alcalin (ALS)	42
III-1-2-3 Fraction insoluble en milieu alcalin (ALI)	43
III-1-3 Analyse de la composition monosaccharidique des différentes fractions pariétales	44
III-1-3 -1 Analyse de la paroi totale (AIS)	44
III-1-3-2 Analyse de la fraction soluble en milieu alcalin (ALS)	45
III-1-3-3 Analyse de la fraction insoluble en milieu alcalin (ALI)	46
III-2 DISCUSSION	48
CHAPITRE IV:IMPLICATION SUR LE SYSTEME EDUCATIF DU SUJET.....	51
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	64
CONCLUSION.....	65
PERSPECTIVES.....	65

BIBLIOGRAPHIE	66
ANNEXES	72

ABSTRACT

Oomycetes are formidable pathogenic agents for cultivated plants and the annual losses cause by this organism is considerable. Among them we have *Pythium myriotylum* (causative agent of cocoyam root rot disease) and *phytophthora megakarya* (agent responsible of black pod disease of cocoa) cause losses in order of 80%. Just like the superior fungi, oomycetes possess a complex and dynamic cell wall which plays an essential role in protection and pathogenicity. To enhance the current knowledge on the role that occupies this wall, as well as its change during the mycelial growth, the polysaccharides of wall (AIS) and the various parietal fractions (ALS and ALI) of mycelium of *P.myriotylum* and *P. megakarya* was analyzed in the 3rd day and 9th day of his growth. Three days and nine days after inoculation of a sporale solution calibrated of *P.myriotylum* and *P. megakarya*, the mycelial masses were collected for extraction of the cell wall (AIS), as well as its various fraction (ALS and ALI); then the monosaccharide profile of different parietal fractions was analyzed. Our results show that the mycelial masses increase in time to these two oomycetes. The yield on extraction shows that there is no quantitative difference at the level of the cell wall to these two oomycetes. In an essential way, the fraction ALS and ALI is more plentiful to *P. megakarya* than at *P. myriotylum*. The analysis by gas chromatography of parietal fraction (AIS) shows at these both oomycetes, a predominance in glucose which increases in time (63.20% to 66.22% at *P. megakarya* and 58.95% to 59.66% at *P. myriotylum*). We also note the presence of the galactose and the mannose as well as the small proportion of N-acétylglucosamine (4.82% to 4.14% at *P. megakarya* and 5.31% to 5.37% at *P. myriotylum*). The fraction ALS and ALI are constituted also mainly by glucose which is more important in the ALI fraction than in the ALS fraction and decreases according to time. We also note in these fractions the presence of minor sugars met at the level of the wall following the example of N-acétylglucosamine which the abundance is marked in the ALI fraction (8.49% to 7.05% at *P. megakarya* and 9.85% to 10.90% at *P. myriotylum*) that in the fraction ALS (1.16% to 5.23% at *P. megakarya* and 4.25 % to 1.28% at *P. myriotylum*). All these results showed a change and continuous remodeling of the oomycetes cell wall during mycelial growth. The discovery of small proportions of N-acetylglucosamine in the cell wall and especially its strong presence in the ALI fraction than the ALS fraction could be determining in the development of new strategies against Oomycetes, in particularly against *P. megakarya* and *P. myriotylum*.

Keywords: wall, polysaccharides, oomycetes, *Phytophthora megakarya*, *Pythium myriotylum*

LISTE DES ABREVIATIONS

AIS : Fraction insoluble dans l'alcool

ALI : Fraction insoluble en milieu alcalin

ALS : Fraction soluble en milieu alcalin

ARN: Acide ribonucléique

CPG: Chromatographie en phase gazeuse

CWP : Cell wall proteins

ERM : Milieu a base d'extraits de racines de macabo

GlcNAc : Acide N- acétylglucosamine

GPI: Glycosylphosphatidylinositol

GPI-CWP: Glycosylphosphatidylinositol- cell wall proteins

LPVRV: Laboratoire de Phytoprotection et de Valorisation des Ressources Végétales

MBM: Malt Broth Mehrlich

Pir: Proteins with internal repeats,

Pir-CWP: Proteins with internal repeats- cell wall proteins

Pm: *Phytophthora megakarya*

Pmy: *Pythium myriotylum*

Ser: Serine

TFA: Trifluoro acetic acid

Thr: Thréonine

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Organisation moléculaire de la paroi cellulaire de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
Figure 2: Chaîne linéaire de chitine.	8
Figure 3: Organisation structurale de la cellulose	10
Figure 4: cycle de vie des oomycètes (Erwin et Ribeiro, 1996)	17
Figure 5: Cycle de développement d'un Oomycète (Roetschi, 2001)	18
Figure 6: Phylogénie actuelle des oomycètes (Cordier Tristan., 2007)	19
Figure 7: Cycle de reproduction des <i>Phytophthora</i>	21
Figure 8: Cabosses de SNK16 infectées par <i>Phytophthora megakarya</i> [(A) attaque apicale; (B) attaque distale; (C) forme momifiée)] (Ondobo, 2014).....	24
Figure 9: Cycle biologique de <i>Pythium sp.</i> (Bagyaraj and Arpana., 2006)	26
Figure 10: Expérience de pathogénicité avec utilisation de deux isolats de <i>Pythium myriotylum</i> (NGR02 and NGR03) sur les tissus de plante de macabo (<i>Xanthosoma sagittifolium</i>) en culture. (A) Brunissement et mort des feuilles de macabo (B) Nécroses ou pourriture des racines infectées. 1) control ; 2) plantes infectée par NGR02 ; 3) plantes infectées par NGR03 (Feyisara <i>et al.</i> , 2014).....	29
Figure 11: Souches de <i>Phytophthora megakarya</i> (A) et <i>Pythium myriotylum</i> (B).....	31
Figure 12: Protocole d'extraction de la paroi totale (Cantu <i>et al.</i> , 2009).....	33
Figure 13: Protocole de fractionnement de la paroi totale d'après Cantu <i>et al.</i> ; 2009.....	34
Figure 14: Chromatogramme (CPG) standard des oses majoritaires de la paroi analysés en quantités équimolaires. Les chiffres au dessus des pics représentent le temps de rétention de chaque sucre. T° initiale= 120°C ; T° de stabilisation= 280°C ; Gaz vecteur = Hélium ;	37
Figure 15: Evolution des masses mycélaire fongique en fonction du temps de culture (B) masse fraîche ; (A) masse sèche.....	40
Figure 16: Variation de la concentration de la paroi totale (AIS) en fonction des jours de culture	42
Figure 17: Variation de la concentration des fractions solubles en milieu alcalin (ALS) en fonction des jours de culture	43
Figure 18: Variation de la concentration des fractions insolubles en milieu alcalin (ALI) en fonction des jours de culture	44
Figure 19: Composition en monosaccharides des parois totales (AIS) chez les deux souches	45

Figure 20: Composition en monosaccharides des fractions solubles en milieu alcalin (ALS) chez les deux souches	46
Figure 21: Composition en monosaccharides des fractions insolubles en milieu alcalin (ALI) chez les deux souches.	47

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Tableau récapitulatif des temps de rétention, exprimés en minutes (min), des glycosides de méthyle correspondant aux oses standards rencontrés majoritairement dans la paroi.....	37
Tableau 2: Rendements de fractionnement de la matrice extracellulaire fongique	41

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La paroi constitue la matrice extracellulaire qui entoure les cellules végétales, les cellules bactériennes et les cellules fongiques. La microscopie électronique révèle que les parois des cellules fongiques sont des structures multilamellaires constituées d'une couche externe amorphe et dense soulignées par une couche interne plus épaisse et transparente (Ruiz-Herrera 1992). La couche interne est composée essentiellement de glucanes et de chitine ; la couche externe est principalement composée des protéines mannosylées (Klis *et al.* 2002). Les composantes de la paroi cellulaire fongique sont divisées en deux fractions en fonction de leur solubilité dans une solution alcaline chaude. La partie insoluble en milieu alcalin (ALI) constitue le squelette structural de la paroi et comprend les β -glucanes covalamment liés à la chitine (Hartland *et al.* 1994). La partie alcaline (ALS) est constituée des protéines, des polysaccharides à l'instar de α -1,3 / 1,4 glucanes, mannanes et galactofurans chez *A. fumigatus* et de β -1,3 / 1,6-glucanes et mannanes chez *S. cerevisiae* (Latge' 2009).

La paroi cellulaire représente une portion importante du poids sec de la cellule fongique. En général, chez les champignons supérieurs elle est composée de polymères linéaires de β -1,4-N-acétylglucosamine (chitine), α -1,3-glucanes, β -1,3- et β -1,6-glucanes, et les protéines, liés entre eux (Adams 2004). Malgré cette généralisation, l'abondance relative et les structures chimiques spécifiques de ces principaux composants diffèrent entre les espèces fongiques de tel sorte que la composition de la paroi peut être utilisée comme marqueur taxonomique pour distinguer deux genres (Leal *et al.* 2001). C'est ainsi que chez les champignons inférieurs, comme chez les oomycètes, le constituant majeur de la paroi est la cellulose (1,4- glucane), et non la chitine (polymère de N-acétylglucosamine) qui est majoritaire chez les champignons supérieurs. La composition chimique des parois cellulaires des champignons et des oomycètes varie en fonction du stade de développement, la morphologique et de l'état physiologique de la cellule (Bowman & Gratuit 2006). Les parois cellulaires sont des coquilles protectives dynamiques et rigides qui subissent des changements continus en fonction des conditions de culture et contraintes environnementales (Gastebois *et al.* 2009). Elles sont essentielles pour la viabilité et pathogénicité fongique. Elles déterminent la morphologie fongique; fournissent une protection osmotique et régulent également les échanges de matériel avec l'environnement extérieur, l'adhésion à un substrat, la pénétration d'un hôte et la communication entre les cellules. La paroi cellulaire fongique, ensemble avec

la paroi cellulaire végétale, forment l'interface où la première interaction plante-microbe se produit ; et est le siège d'événements qui déterminent des résultats de cette interaction (Cantu *et al.* 2008a). C'est le cas de certains oomycètes phytopathogènes à l'instar de *Phytophthora megakarya* et *Pythium myriotylum*.

Phytophthora megakarya et *Pythium myriotylum*, deux oomycètes respectivement responsables de la pourriture brune des cabosses de cacao (*Theobroma cacao*) et de la pourriture racinaire du macabo (*Xanthosoma sagittifolium*) sont la cause majeure de la décroissance pré et post-récolte de ces cultures. Les informations importantes existent sur la génétique des oomycètes (John Wiley & Sons 2009) et plus particulièrement sur la virulence des genres *Phytophthora* (Akrofi 2015) et *Pythium* (Boudjeko *et al.* 2006). Cependant les informations sur la composition de la paroi cellulaire de ces phytopathogènes et les changements observés au cours de la croissance mycélienne sont limitées. Ainsi une meilleure connaissance des parois cellulaires d'un agent pathogène, de leurs surfaces, et des molécules qu'elles libèrent dans le milieu, peut aider à comprendre les mécanismes impliqués dans sa biologie et sa pathogénicité (Badreddine 2008). Par conséquent, la connaissance de la composition de la paroi cellulaire de *Phytophthora megakarya* et *Pythium myriotylum* ainsi que son changement au cours de la croissance mycélienne pourrait être un atout dans les stratégies de lutte contre les maladies causées par ces deux phytopathogènes en particulier et contre les oomycètes en général.

L'objectif général de notre travail est d'analyser les polysaccharides de la paroi cellulaire de *Phytophthora megakarya* et de *Pythium myriotylum* à différents jours de leur croissance afin de mieux comprendre leur mécanisme de pathogénicité et de développer plus tard les moyens de lutte contre ces phytopathogènes. Cette analyse se fera plus spécifiquement à travers:

- ❖ L'extraction de la paroi brute (AIS) ainsi que son fractionnement (ALS et ALI) à différents jours de la croissance mycélienne (troisième et neuvième jour) ;
- ❖ L'analyse du profil monosaccharidique de ces différentes fractions pariétales à différents jours de la croissance mycélienne.

CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTERATURE

I-1 Généralités sur la paroi cellulaire des champignons et des oomycètes

La paroi est la matrice extracellulaire qui entoure la cellule (végétale, bactérienne et champignons). Chez les microorganismes eucaryotes, elle est principalement composée de polysides et de protéines. Chez les champignons, la chitine et les β -glucanes sont les polysaccharides structuraux majeurs. Les oomycètes pour leur part, ont été considérés pendant longtemps comme des microorganismes cellulotiques. Cependant la présence de la chitine a été démontrée au sein de cette classe. Comme la chitine est absente chez les vertébrés et les plantes supérieures, elle représente une cible pour le développement de produits antimicrobiens (Madrid *et al.* 2003). Malgré de nombreuses études, les mécanismes de biosynthèse des polysides, leur structure et leur organisation dans la paroi cellulaire des champignons et oomycètes, sont encore mal connues.

I-1-1 Rôles et fonctions de la paroi cellulaire

La paroi permet à la cellule de réaliser de nombreuses fonctions indispensables à la physiologie de la cellule et de l'organisme tout entier. La paroi cellulaire est importante dans la biologie et la pathogenèse d'un microorganisme. Elle assure le maintien de la cellule et définit la taille et la forme de celle-ci (Moore *et al.* 2006). La paroi participe à la régulation des relations cellulaires et intervient aussi de manière passive dans les phénomènes de transport, d'absorption et de sécrétion de multiples substances. Elle assure la défense contre les stress biotiques ou abiotiques (Moore *et al.* 2006). En plus de son rôle mécanique qui régit les phénomènes de croissance cellulaire, la paroi intervient dans la cohésion et la communication intercellulaire. Au delà de fournir une armature rigide à la cellule, la paroi cellulaire est une structure dynamique impliquée dans le développement des organismes, la différenciation tissulaire et la protection vis-à-vis des attaques extérieures. Chez les microorganismes, la paroi cellulaire est un élément essentiel dans la croissance et la survie cellulaires (Cabib *et al.* 2001). A l'absence de cette barrière, la cellule serait plus exposée aux changements environnementaux et aux stress osmotiques. La paroi est le compartiment essentiel pour le microorganisme. Chez les agents pathogènes, elle est un réservoir de molécules impliquée dans la reconnaissance de l'hôte, l'adhésion et la colonisation. D'autre part, certains composés d'origine pariétale sont connus comme étant des éliciteurs des réponses de défense des plantes (Sonja *et al.* 2004).

I-1-2 Composition de la paroi cellulaire des oomycètes et des champignons

En général, les parois cellulaires de champignons supérieures sont constituées de polymères linéaires de β -(1,4)-N-acétylglucosamine (chitine), α -(1,3)-glucanes, β -(1,3)-glucanes et β -(1,6)-glucanes et les protéines ; avec des liaisons étendues entre ces composés (Adams 2004). La microscopie électronique révèle que les parois des cellules fongiques sont des structures multilamellaires constituées d'une couche externe amorphe et dense soulignée par une couche interne plus épaisse et transparente (Figure 1) (Ruiz-Herrera 1992). La couche interne est composée essentiellement de glucanes et de chitines disposées en microfibrilles entrelacées et la couche externe dense est principalement composée de protéines mannosylées de manière covalente (Figure 1) (Klis *et al.* 2002). Une architecture multilamellaire similaire est trouvée dans les parois de champignons mycéliens tels que *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium oxysporum*, et *Neurospora crassa* (Chiou *et al.* 2001). La paroi cellulaire des oomycètes contient essentiellement des β -(1,3) et β -(1,6)- glucanes et de la cellulose (Bartnicki-Garcia 1968), tandis que les principaux polysaccharides structuraux des parois cellulaires de champignons supérieurs sont des β -(1,3) et β -(1,6)-glucanes et de la chitine (Bartnicki-Garcia 1968). Bien que les oomycètes soient généralement considérés comme des organismes cellulotiques non chitineux, le dosage des sucres aminés a révélé de petites quantités d'hexosamines dans les hydrolysats de parois cellulaires de différents oomycètes. L'hexosamine majeure a été identifiée comme de la GlcNAc à la suite d'une hydrolyse enzymatique des parois par une chitinase et de l'analyse chromatographique des hydrolysats chez différentes espèces de Saprolegniales et Péronosporales. Les auteurs de ces études ont suggérés que la GlcNAc mesurée constitue de la chitine qui serait présente avec une teneur plus élevée chez les Saprolegniales (*Achlya* et *Saprolegnia*) que chez les Péronosporales (*Pythium*) (Sonia & Dietrich 1975). Ceci est cohérent avec une étude antérieure montrant que des espèces de *Phytophthora*, membre des Péronosporales, contiennent une teneur en hexosamines dans leurs parois souvent inférieure à 1% (Bartnicki-Garcia 1968).

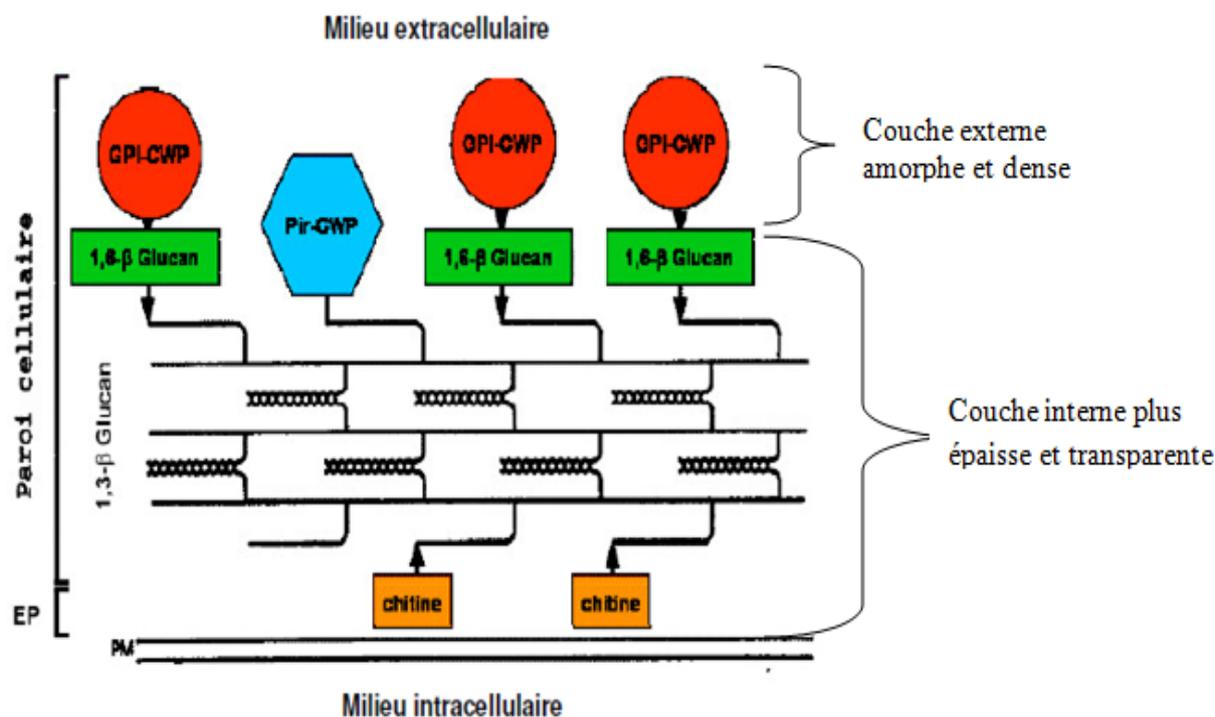


Figure 1 Organisation moléculaire de la paroi cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*

La paroi cellulaire est constituée d'une structure squelettique interne formée par un réseau tridimensionnel de β -(1,3)-glucanes qui entoure la cellule entière. Des mannoprotéines sont retrouvées à l'extérieur de cette structure squelettique. Les mannoprotéines Pir (Pir-CWP) sont directement liées covalamment aux molécules de β -(1,3) glucanes tandis que les mannoprotéines GPI (GPI-CWP) sont indirectement liées par l'intermédiaire de β -(1,6)-glucanes aux β -(1,3)-glucanes. La structure squelettique est aussi renforcée par une faible quantité de chitine liée covalamment aux β -(1,3)-glucanes les plus profonds de cette structure. PM : membrane plasmique, EP : espace périplasmique, CWP : «cell wall proteins», mannoprotéines de la paroi cellulaire, Pir : «Proteins with internal repeats», mannoprotéines qui possèdent des séquences internes répétées, GPI : reste de groupement glycosylphosphatidylinositol. D'après Smits *et al.* (2001).

I-1-2-1 La chitine (β -(1,4)-N-acétylglucosamine)

La chitine est le deuxième polysaccharide le plus abondant dans la nature, après la cellulose. Il est largement distribué chez les eucaryotes, incluant des organismes unicellulaires (levures, amibes, diatomées) et pluricellulaires (champignons filamenteux, arthropodes, nématodes, mollusques) (Ehrlich *et al.* 2007). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la chitine compte seulement pour un faible pourcentage (1-2 %) du poids de paroi cellulaire sèche (Osmond *et al.* 1999), tandis que chez les champignons filamenteux, la chitine peut

représenter jusqu'à 60 % du contenu pariétal (Ruiz-Herrera 1992). Chez certains oomycètes, la chitine représente entre 0,7 et 3,4% des parois sèches (Bulone *et al.* 1992).

La chitine est un polysaccharide de structure cristalline constituée de longues chaînes linéaires contenant plus de 1000 résidus de N-acétylglucosamine (GlcNAc, 2-acetamido-2-deoxy- D-glucose) liés par des liaisons β -(1,4) (Figure 2). Ces derniers peuvent être libérés de la paroi cellulaire après l'action de chitinase de plantes hôtes ou de chitinases endogènes (Bulone *et al.* 1992). Environ 20-400 chaînes du polysaccharide s'associent par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes pour créer la forme structurale du polysaccharide et donner naissance à des microfibrilles qui confèrent le rôle squelettique de la chitine (Ruiz-Herrera & San-Blas 2003). La chitine est polymorphique, présentant trois formes cristallines différentes, α , β , et γ . Les trois formes se distinguent par le degré d'hydratation, la taille et le nombre de chaînes de chitine. Dans la chitine α , les chaînes polysaccharidiques sont disposées de façon antiparallèle, ce qui donne naissance à de nombreux ponts hydrogènes, et entraîne une rigidité importante et une faible sensibilité aux agents de déacétylation. La chitine α n'est pas soluble dans les solvants aqueux et constitue la forme la plus abondante du polysaccharide, largement distribuée dans les carapaces de crabes et crevettes ainsi que dans les parois cellulaires des champignons (Noishiki *et al.* 2005). La chitine β est une forme moins abondante. Elle est présente chez un nombre limité d'espèces d'animaux et certaines diatomées (Noishiki *et al.* 2005), dont les chaînes polysaccharidiques sont toutes parallèles entre elles; les ponts hydrogènes y sont moins nombreux, ce qui confère à la chitine β une plus grande réactivité et hydrophilie. Enfin la troisième forme, la chitine γ , implique deux chaînes parallèles qui alternent avec une chaîne antiparallèle et semble être une forme qui n'apparaît qu'*in vitro* à la suite de certains traitements chimiques.

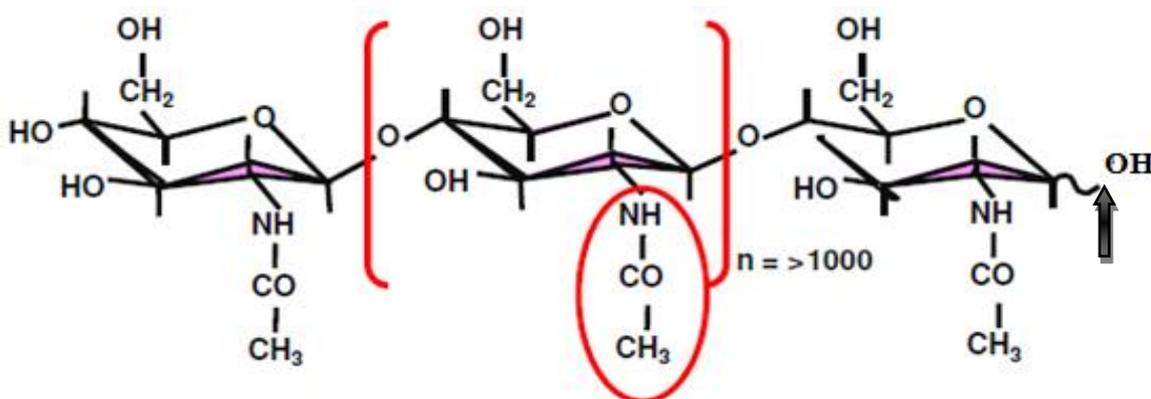


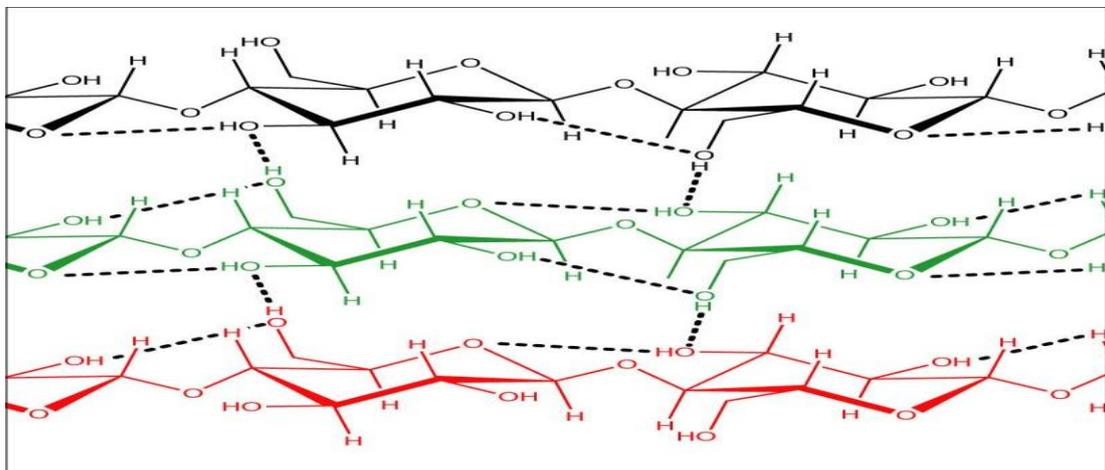
Figure 2: Chaîne linéaire de chitine.

L'unité N-acétylglucosamine indiquée entre parenthèses constitue l'unité répétitive du polymère de chitine. Le groupement acétylé est entouré en rouge. La flèche indique l'extrémité réductrice de la chaîne (Badreddine 2008).

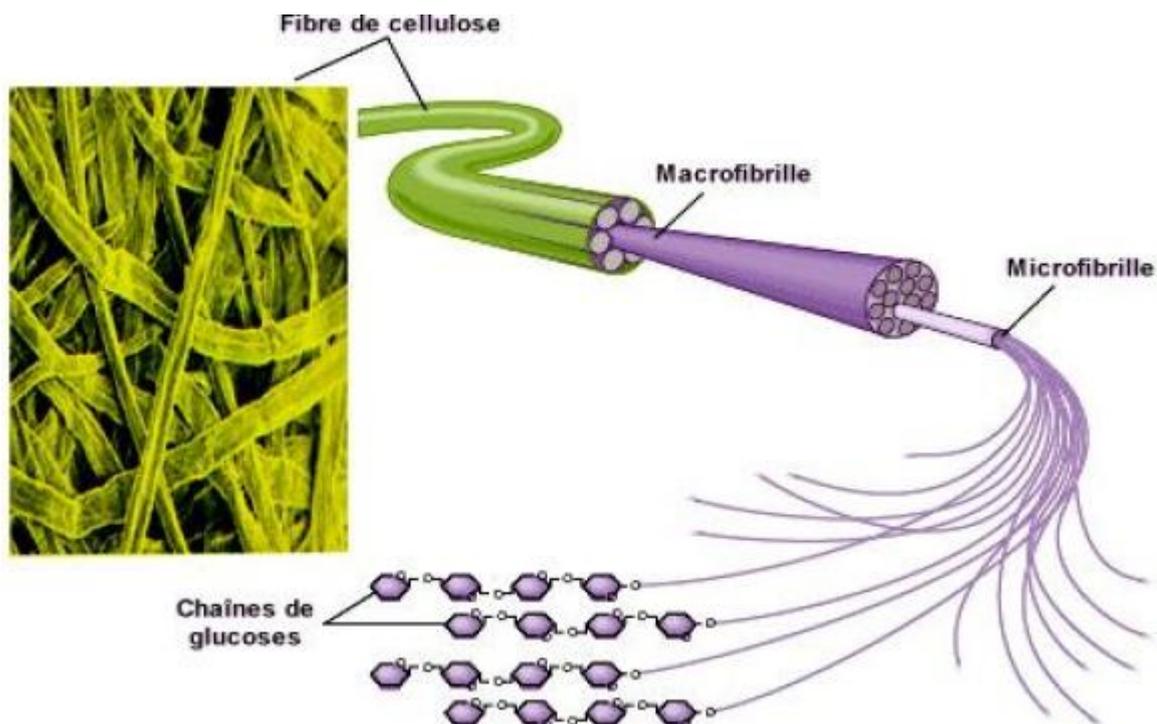
I-1-2-2 La cellulose

La cellulose est le polysaccharide le plus abondant dans la nature. Bien que les champignons soient considérés comme des organismes chitineux, des traces de cellulose ont parfois été détectées dans leurs parois cellulaires mais aucun gène de cellulose synthase n'a été identifié. Chez les oomycètes cellulotiques la teneur en cellulose dans les parois cellulaires de différentes espèces de *Phytophthora* a été mesurée. Dans le mycélium de *P. cinnamomi* cette teneur est estimée à 11% (Bartnicki-Garcia 1968). Les parois des sporanges et des kystes de *P. palmivora* contiennent respectivement 27% et 30% de cellulose. Dans les parois des oospores de *P. megasperma var. sojae* le contenu en cellulose est de seulement 7% (Lippman *et al.* 1974).

Dans la nature, la plupart de la cellulose produite est une cellulose cristalline définie comme cellulose I (Saxena & Brown 2005). C'est un polymère de 8,000-10,000 monomères de glucose liés par des liaisons $\beta(1,4)$. Les polymères individuels sont alignés en configuration parallèle et jusqu'à 90% de la cellulose est cristalline. Les chaînes de glucose sont étendues et non repliées sur elles mêmes grâce à la présence de liaisons hydrogènes intra-chaînes. L'existence de liaisons hydrogènes inter-chaînes entraîne la formation de fibres qui confèrent à la cellulose un rôle de squelette (Figure 3). Cet assemblage lui confère diverses propriétés physiques dont la possibilité de former deux structures cristallines I α ou I β qui pourraient coexister dans des microfibrilles en rapport variable (Saxena et Brown 2005). Généralement, la structure I α est produite par des organismes primitifs comme des bactéries, des algues vertes, alors que la structure I β est présente chez les végétaux supérieurs, certains animaux, et seulement chez quelques procaryotes (Ross *et al.* 1991). Quant aux oomycètes, ils produisent une cellulose I β faiblement cristalline (Helbert *et al.* 1997).



A



B

Figure 3. Organisation structurale de la cellulose

A: Chaînes de glucose avec liaisons hydrogènes intra- et inter-chaînes. **B:** Assemblage des chaînes linéaires de glucose pour former une microfibrille dans le milieu extracellulaire. L'ensemble de plusieurs microfibrilles constitue les macrofibrilles, qui forment elles-mêmes les fibres de cellulose (Badreddine 2008).

I-1-2-3 Les autres polysaccharides pariétaux

En plus de la chitine ou de la cellulose, d'autres polysaccharides sont présents dans les parois cellulaires d'oomycètes et de champignons à l'instar des β -(1,3)-, β -(1,6)-, α -(1,3)-glucanes et les galactomannanes.

➤ Les β -(1,3)-glucanes

Les β -(1,3)-glucanes sont composés de longs polymères linéaires de β -(1,3)-glucose avec quelques ramifications en position β -(1,6). Les chaînes de β -(1,3)-glucanes sont constituées d'environ 1500 unités de glucose, avec une structure microfibrillaire qui peut participer à la rigidité des parois cellulaires. Les β -(1,3)-glucanes peuvent être liés covalamment à d'autres composés des parois. Ses régions non réductrices se lient aux extrémités réductrices de chaînes de chitine via des liaisons β -(1,4)-, β -(1,6)- et β -(1,3)-glucanes (Lesage & Bussey 2006). Chez les levures, les parois cellulaires de *C. albicans* et *S. cerevisiae* contiennent

respectivement 30-39% (Ruiz-Herrera *et al.* 2006) et 30-45% de β - (1,3)-glucanes (Aguilar-Uscanga & François 2003). Chez les oomycètes, des études détaillées chez le genre *Phytophthora* ont permis d'évaluer la teneur et la structure des β - (1,3)-glucanes appelés aussi glucanes non cellulosiques. Le mycélium de *P. cinnamomi* contient 66% de β -(1,3)-glucanes (Bartnicki-Garcia 1968). Ils sont constitués de β -(1,3)- glucanes fortement ramifiés avec des liaisons β -(1,6)- aux points de branchement. Il y a en moyenne quatre résidus par ramification. De plus 10% du glucose dans ces glucanes non cellulosiques seraient liés par des liaisons β -(1,4). Chez une autre espèce, *P. palmivora*, les parois cellulaires des kystes et des sporanges contiennent respectivement 48 et 54% de glucanes non cellulosiques dont 6-8% sont des unités de glucoses avec des liaisons β -(1,3). Chez *P. megasperma var. sojae* les parois d'oospores contiennent 68% de glucanes non cellulosiques (Lippman *et al.* 1974) et leur structure est similaire à celle observée chez *P. cinnamomi* (Zevenhuizen & Bartnicki-Garcia 1969).

➤ **β -(1,6)-glucanes**

Les β -(1,6)-glucanes sont formés d'environ 350 résidus de glucose. Les chaînes de β -(1,6)-glucose sont de nature amorphe (Kollar *et al.* 1997) et pourraient agir comme une «colle» en formant des liaisons covalentes avec des β -(1,3)-glucanes, de la chitine et des mannoprotéines des parois cellulaires (Kollar *et al.* 1997). Les β -(1,6)-glucanes représentent 43-53% et 5-10% de la paroi respectivement chez *C. albicans* et *S. cerevisiae* (Ruiz-Herrera *et al.* 2006). Outre ces levures, les β -(1,6)-glucanes ont été largement rapportés parmi les champignons filamenteux, incluant les Hemi-, Archae-, Euascomycètes et Basidiomycètes (Vink *et al.* 2004).

I-1-2-4 Les protéines pariétales

Les protéines représentent à côté des polysaccharides une des composantes majeures de la paroi cellulaire. Ces protéines peuvent être covalamment liées (protéines structurales) ou non (protéines enzymatiques) à la paroi. Diverses études ont montré que les champignons et les oomycètes pathogènes de plantes produisent une grande variété de protéines extra cytoplasmiques pour initier et soutenir le processus infectieux (Birch *et al.* 2006). La plupart des protéines de la paroi fongique ont une fonction structurale, cependant, plusieurs sont aussi impliquées dans la biosynthèse de la paroi, le remodelage post synthétique, l'adhésion et la protection contre les réponses de l'hôte (Bowman & Free 2006, De Groot *et al.* 2005)

I-1-2-4-1 Les protéines structurales

Les protéines structurales, encore appelées cell wall proteins (CWP) sont des protéines associées de façon covalente à la paroi cellulaire et possèdent une teneur élevée en mannose polymérisé d'où l'appellation de mannoprotéines. Sur le plan de la biosynthèse, ces protéines sont initialement synthétisées au réticulum endoplasmique où s'effectue l'ajout des premiers sucres N- et O-liés. Ensuite, elles empruntent la voie de sécrétion et subissent des modifications et élongations de leurs chaînes glucidiques. Deux classes de CWP sont connues : la première classe majoritaire est représentée par des protéines qui subissent un processus de glycosylation et d'ancrage aux membranes, via l'attachement d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). Les GPI-CWP sont des protéines fortement O-glycosylées, généralement riches en Ser/Thr et dont la séquence contient dans la région N-terminale un peptide signal pour la sécrétion et la région C-terminal hydrophobe fonctionne comme un peptide signal pour l'addition d'une ancre membranaire GPI (De Groot *et al.* 2005). L'adjonction d'une ancre GPI constitue un mécanisme par lequel les CWP sont ensuite liées covalamment à la surface de la cellule (Klis *et al.* 2002). La liaison covalente des protéines GPI-CWP dans les parois cellulaires de *S. cerevisiae* et d'autres ascomycètes est établie par une liaison directe aux β -(1,6)-glucanes, qui relie les GPI-CWP aux β -(1,3)-glucanes (Kollar *et al.* 1997). La deuxième classe de CWP contient des protéines avec des répétitions internes, les Pir-CWP (protein with internal repeats : Pir). Les Pir-CWP sont fortement O-glycosylées et caractérisées par la présence d'un nombre variable de répétitions internes. Leur présence chez les ascomycètes et les deutéromycètes semble être universelle ; et leur organisation la plus fréquente inclut la présence d'un peptide signal, un domaine de 2 à 11 séquences répétées ainsi qu'une région C-terminale avec 4 résidus de cystéine à des positions conservées. Elles ne contiennent cependant pas de séquence signal C-terminale pour l'ajout d'une ancre GPI. Les Pir-CWP semblent être liées directement aux molécules de β -(1,3)-glucanes sans interconnexion avec les β -(1,6)-glucanes.

Chez les oomycètes, la disponibilité du génome complet de *Phytophthora ramorum* a permis la recherche des gènes codant des protéines pariétales putatives. L'analyse *in silico* a indiqué que cet organisme contient 1188 protéines sécrétées putatives (Jiang 2006), parmi lesquelles environ 100 protéines sont prédites comme des protéines à ancre GPI (Jiang 2006). Cependant aucune protéine GPI n'a été identifiée dans le cadre d'une étude directe des parois cellulaires de *P. ramorum* par une approche protéomique, suggérant que les protéines GPI

chez cet organisme ne sont pas ou rarement retenues au niveau des surfaces cellulaires, contrairement aux protéines GPI de levures (Meijer *et al.* 2006).

I-1-2-4-2 Les protéines Enzymatiques

Tout oomycète phytopathogène sécrète potentiellement un mélange d'hydrolases impliquées dans le remodelage de sa propre paroi (notamment les β -(1,4), β -(1,3)- et β -(1,6)-glucanases dégradant respectivement la cellulose, les β -(1,3)- et β -(1,6)-glucanes), et/ou dans son pouvoir pathogène, dégradant des composés pariétaux de sa plante hôte (protéines, cellulose, xylanes, pectine et arabinanes) (Badreddine 2008). Chez les champignons et oomycètes la plupart des enzymes hydrolytiques associées aux parois jusqu'à maintenant ont une activité chitinase ou glucanase. Ces enzymes peuvent être nécessaires pour la croissance ou la nutrition. Certaines d'entre elles jouent un rôle dans la dégradation de polymères imperméants, rendant ainsi leurs produits accessibles à l'absorption; et d'autres sont impliquées dans la dégradation ou la synthèse des polymères de la paroi cellulaire.

➤ Les glucanases

Les glycosyles hydrolases qui agissent sur les β -glucanes chez les champignons ont été impliquées dans le développement et la signalisation (Cid *et al.* 1995). Deux classes d'activité β -(1,3)-glucanase sont retrouvées chez la levure, l'activité exoglucanase majoritaire, et l'activité endoglucanase, minoritaire. Ces glucanases peuvent être synthétisées de façon constitutive et sécrétées dans l'espace périplasmique, puis être éventuellement libérées dans le milieu de culture où elles s'accumulent (Cid *et al.* 1995). Les enzymes correspondantes ne sont pas particulièrement spécifiques aux β -(1,3)-glucanes. Elles agissent également sur les liaisons des β -(1,6)-glucanes mais avec une efficacité moindre. Certaines de ces glucanases ont un rôle dans la séparation des cellules.

Chez les champignons filamenteux, deux exo- β -(1,3)-glucanases et une endo- β -(1,3)-glucanase ont été détectées dans des autolysats de parois cellulaires d'*Aspergillus fumigatus*. La paroi cellulaire d'*A. fumigatus* contient également un certain nombre de glucanases qui possèdent une activité β -(1,3)-glucanosyltransférase. Ces enzymes clivent des β -(1,3)-glucanes, ensuite transfèrent l'extrémité réductrice générée vers l'extrémité non réductrice d'une autre molécule de β -(1,3)-glucane. La nouvelle liaison formée permet ainsi l'élongation de la chaîne de β -(1,3)-glucane.

Au sein des oomycètes, cinq gènes codant des glucanases ont été caractérisés chez *Phytophthora infestans* : trois gènes putatifs d'exo- β -(1,3)-glucanases (Piexo1, Piexo2 et

Piexo3), un gène d'endo- β -(1,3)-glucanase (Piendo1) et un gène d'endo- β -(1,3)-, (1,4)-glucanase (Piendo2) (McLeod *et al.* 2003). Les gènes de glucanases sont fortement conservés entre *Phytophthora* et *Pythium* (McLeod *et al.* 2003). Les cinq glucanases font partie de trois familles différentes de glycosyl hydrolases et présentent une forte homologie avec des gènes de champignons, à l'exception de Piendo2 (McLeod *et al.* 2003). La localisation subcellulaire des protéines correspondantes n'a pas été étudiée et leur implication dans la dynamique pariétale ou le pouvoir pathogène n'est pas connue. La paroi des oomycètes se caractérisant par la présence de cellulose, on peut également imaginer que des cellulases pourraient être impliquées dans la dynamique de la paroi, mais ce point n'a pas fait l'objet d'études publiées, jusqu'à présent.

➤ Les chitinases

Chez la levure, la synthèse de la chitine est localisée préférentiellement dans la région du septum, et est importante pour la stabilité mécanique de cette jonction temporaire entre la cellule mère et la cellule fille. Ensuite la dégradation de ce septum est impérative pour permettre à la cellule fille de devenir indépendante. Toutefois, contrairement aux nombreuses activités glucanases caractérisées chez la levure, une seule activité endochitinase a été caractérisée chez *S. cerevisiae* (Cid *et al.* 1995). Elle correspond au produit du gène CTS1. Un gène codant une deuxième chitinase, CTS2, a également été identifiée chez *S. cerevisiae*.

Chez *C. albicans* trois gènes de chitinases ont été clonés, CHT1, CHT2 et CHT3. Le gène CHT1 code une protéine de 42 kDa, CHT2 et CHT3 codent des protéines de 61 kDa (McCreath *et al.* 1996). Contrairement à *S. cerevisiae*, une chitinase liée covalamment à la paroi a été caractérisée chez *C. albicans*, de type GPI-CWP, qui correspond au produit du gène CHT2 (Iranzo *et al.* 2002).

Les champignons filamenteux possèdent une famille très large de chitinases (Adams, 2004) qui sont classées en deux groupes. Les enzymes du premier groupe partagent des similarités structurales avec des chitinases de plantes et sont putativement associées à la paroi cellulaire, suggérant un rôle dans le remodelage de la paroi durant la croissance. Les chitinases du deuxième groupe sont plutôt proches des chitinases de bactéries, impliquées dans la dégradation de chitine exogène considérée comme source d'énergie et de nutriments. Chez les oomycètes, la seule chitinase caractérisée, est la chitinase sécrétée AaChi1 d'*Aphanomyces astaci*, parasite de l'Ecrevisse, qui est potentiellement impliquée dans la dégradation de la cuticule de l'hôte (Andersson & Cerenius, 2002).

Plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse ou le remodelage de la paroi sont produites sous forme de zymogènes inactifs, ou bien nécessitent une régulation négative une

fois leur travail effectué, ce qui implique l'activité d'enzymes protéolytiques. Des protéases peuvent également être impliquées dans les mécanismes d'adhésion et d'invasion. Elles ont été particulièrement étudiées chez *C. albicans* (Bektic *et al.* 2001).

I-2 Généralités sur les oomycètes

Les oomycètes constituent un groupe de microorganismes filamenteux d'environ 600 espèces, comprenant des saprophytes, ainsi que des parasites de plantes et d'animaux. Les oomycètes les plus étudiés sont les parasites de plantes responsables d'importants dégâts sur les cultures agricoles et horticoles. Les oomycètes les mieux connus sont *Phytophthora infestans*, pathogène foliaire responsable de dégâts sur les cultures de pomme de terre et *Plasmopara viticola*, pathogène de la vigne. La plupart des oomycètes pathogènes de plantes fait partie de deux ordres à savoir les Saproblégniales et les Péronosporales (Dick 1999).

Le mécanisme d'infection des plantes par les oomycètes s'est diversifié, évoluant de l'opportunisme ou du saprophytisme, à la biotrophie obligatoire (Albugo, downy mildews), passant par des étapes intermédiaires d'hémibiotrophie (*Pythium*, *Phytophthora*) (Thines & Kamoun 2010). Les oomycètes pathogènes des plantes peuvent être divisés en deux principales catégories à savoir les biotrophes et les nécrotrophes. Les biotrophes obtiennent les nutriments dont ils ont besoin à partir des cellules des plantes vivantes et les nécrotrophes acquièrent leur nutriment à partir des cellules des plantes mortes (Oliver & Ipcho 2004). Parmi les oomycètes phytopathogènes, on peut trouver des agents biotrophes, comme *Bremia lactucae* pathogène sur la laitue, *Hyaloperonospora parasitica* sur les choux, et *Plasmopara viticola* sur la vigne. *Phytophthora infestans* ainsi que *Phytophthora sojae* pathogène du soja sont nommés hémibiotrophes car leur mode de développement passe d'abord par une phase biotrophe où l'oomycète développe des structures nourricières puis s'en suit la mort des cellules infectées qui accompagne la phase nécrotrophe (Perfect *et al.* 2001). Les oomycètes sont des organismes eucaryotes se développant au sein des tissus végétaux sous forme de mycélium, formant des hyphes non cloisonnés, composés de cellules multi-nucléées. Les champignons phytopathogènes ont des cycles de vie très semblables avec une germination des spores qui s'accompagne d'une formation d'appressorium pour percer la cuticule des feuilles.

I-2-1 Biologie des Oomycètes

L'appareil végétatif (ou thalle) des oomycètes (classe à laquelle appartient le genre *Pythium* et *phytophthora*) est appelé mycélium (du grec *mykes* : champignon et *-lium* : epithellium) comme pour les champignons. Il est hyalin, non pigmenté, ramifié et coenocytique, c'est-à-dire qu'il n'est pas cloisonné (non septé). On parle encore de siphon, le cytoplasme est multi-nucléé et se déplace librement dans le mycélium. Cette propriété est une des grandes différences qui sépare les oomycètes des champignons, qui eux, sont septés. Sur de vieilles cultures de *Phytophthora*, il arrive que des pseudo-cloisonnements apparaissent (Cordier Tristan 2007).

Les Oomycètes sont des organismes à croissance mycélaire et à structures végétatives diploïdes. Leur multiplication peut se faire de façon sexuée ou asexuée. Les thalles sont des filaments, formés par un mycélium coenocyclique et halin dont les hyphes peuvent être peu/abondamment ramifiées (Figure 5). Les Oomycètes sont des organismes aquatiques ou affectionnant l'humidité. Contrairement aux autres mycètes qui ont une paroi riche en chitine, ils ont une paroi riche en glucanes et en cellulose. Le stade diploïde occupe la majeure partie de leur cycle de développement (Figure 4). C'est l'une des différences majeures qui a conduit les systématiciens à déclassifier les oomycètes des champignons. Les oomycètes sont dit fongiformes compte tenu de leur croissance filamenteuse. Ces organismes, contrairement à tous les autres eucaryotes, n'ont pas besoins de stéroïls durant la croissance de leur mycélium. En revanche, une source exogène est nécessaire pour la reproduction (sexuée et asexuée). La diploïdie est conservée tout au long de la vie de l'oomycète. Lors de reproduction sexuée, l'organisme hermaphrodite produit des organes sexuels (oogone et anthéridie) dans lesquels la méiose aura lieu pour libérer les gamètes, juste avant la fécondation.

Les oomycètes produisent des cellules à deux flagelles (spermatocytes). Les souches sont, peu ou très pathogènes et plus ou moins virulentes selon les conditions de l'environnement, la souche et l'espèce infectée. Ils peuvent croître sans plante-hôte mais ont besoin de stéroïls pour terminer leur cycle biologique et fabriquer des oospores. Sans ces stéroïls ils ne peuvent se reproduire (Figure 5). La reproduction sexuée des Oomycètes est une oogamie siphonogame. Les oospores se forment par fécondation d'un spermatocyte (gamètes male) mobile et d'une oogone (gamète femelle) immobile. Le spermatocyste émet un prolongement et un tube copulateur qui traverse le périplasme pour pénétrer dans l'oosphère où il se vide de son contenu. Les gamètes fusionnent pour former l'oospore. Comme la méiose précède toujours la fécondation, le cycle se déroule à l'état diploïde (Figure 4). Les

oospores ainsi formées sont entourées de deux membranes très résistantes et ont un pouvoir infectieux d'au moins deux ans.

La sporulation chez les oomycètes se passe sur la cellule hôte à travers les hyphes qui envahissent la cavité sous épidermique ou stomatique et gonflent pour donner des sporocystophores ou conidiophore branchus qui passent par l'ouverture des stomates. Ces sporocystophores sont ramifiés et chaque ramification porte trois stérigmates sur lesquels sont insérés des sporocystes ovoïdes. Les sporocystes qui se forment à l'apex des hyphes sont exposés à la lumière et sont à la base de la reproduction asexuée (Figure 5).

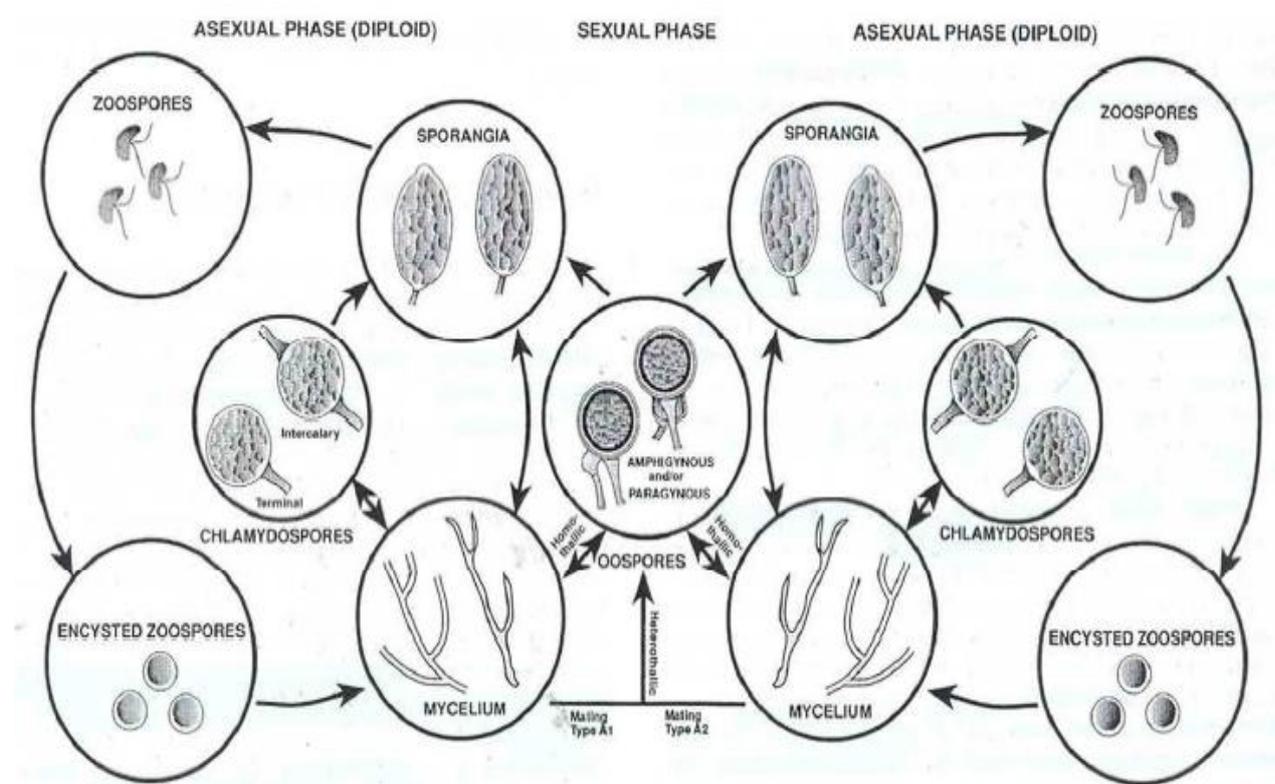


Figure 4: cycle de vie des oomycètes (Erwin et Ribeiro 1996)

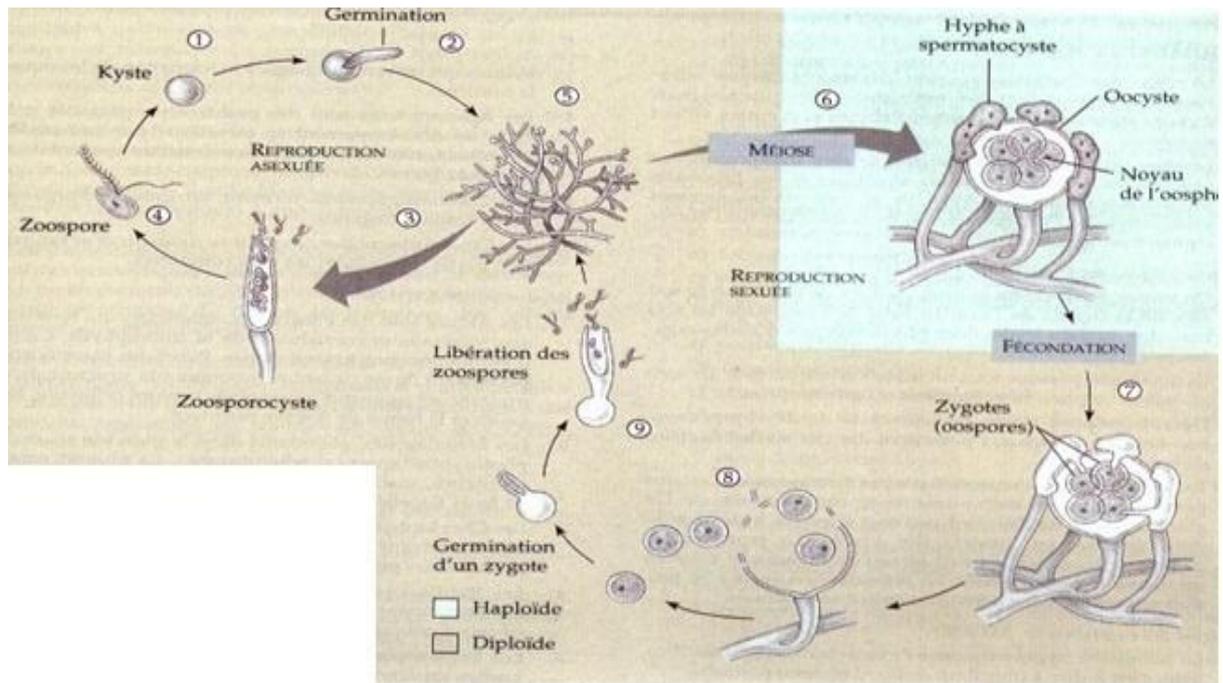


Figure 5 Cycle de développement d'un Oomycète (Roetschi 2001)

(1) Les spores enkystées se posent sur un substrat favorable et germent (2). (3) Il se forme un réseau d'hyphes cénocytique. (4) À l'extrémité des hyphes se forment des zoosporocystes tubulaires qui relâchent des zoospores à deux flagelles. (5) Puis l'organisme commence à former des structures sexuées. (6) La méiose produit des oosphères à l'intérieur des oocystes et des hyphes spermatocytes sur le pourtour de l'oosphère. (7) Les hyphes vont déposer leurs noyaux dans les oosphères. (8) L'oosphère se désintègre et libère les oospores. (9) Les oospores germent puis libèrent les zoospores

I-2-2 Phylogénie et classification des oomycètes

Les oomycètes ont longtemps été classés dans les *Phycomycetes*, dans la lignée des champignons (*Fungi*) en raison de leur croissance filamenteuse. Plusieurs chercheurs, notamment DICK (1982) et BARR (1983), ont soutenu l'hypothèse selon laquelle les oomycètes ne font pas partie des champignons mais des algues hétérokonthes, notamment par l'observation des zoospores biflagellées des oomycètes, qui sont les spores principales de reproduction asexuée, caractéristique commune avec les algues hétérokonthes. C'est en 1990 que l'hypothèse est validée grâce aux recherches sur l'ARN ribosomal (Förster *et al.* 1990). Les oomycètes ne sont définitivement pas des champignons (Figure 6).

La classe des oomycètes fait partie du règne des eucaryotes, dans la lignée des Stramenophile. C'est à ce niveau que les champignons et les oomycètes se séparent au niveau de l'arbre phylogénétique. Les oomycètes regroupent plusieurs ordres de pathogènes, on

trouve notamment des pathogènes de l'ordre des *Saprolegniales* qui parasitent des poissons et amphibiens. L'ordre des *Péronosporales* héberge la famille des *Peronosporaceae* qui regroupe plusieurs genres de parasites des végétaux, dont le mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*, parasite obligatoire). Les *Phytophthora* sont classés dans cet ordre. Nous avons aussi l'ordre des *Pythiales*, qui contient notamment la famille des *Pythiaceae*, et plus précisément au genre *Pythium* décrit pour la première fois par PRINGSHEIM en 1858. Les *Pythium* sont surtout connus pour leur rôle dans les fontes de semis (Cordier Tristan 2007).

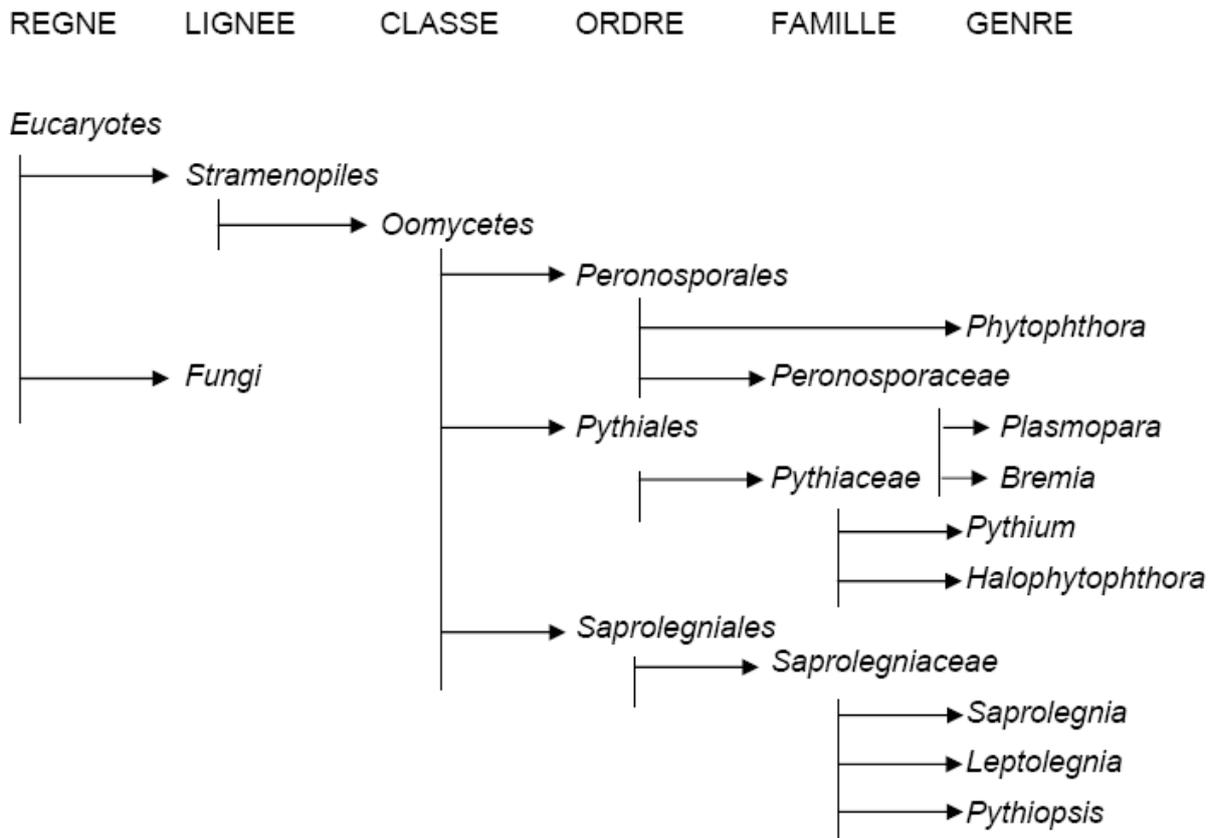


Figure 6 Phylogénie actuelle des oomycètes (Cordier Tristan 2007)

I-3 Généralité sur l'espèce *Phytophthora megakarya*

Le genre *Phytophthora*, nommé en 1876 par Anton de Bary provient du grec Phyton et Phtheiro qui signifie destructeur des plantes ; il appartient au groupe des Oomycètes. Ce sont tous des organismes qui possèdent des spores portant deux flagelles et qui s'apparentent davantage aux algues plutôt qu'aux champignons. Cependant, à la différence des algues, les Oomycètes ne possèdent pas de chlorophylle. Les maladies des plantes causées par les Oomycètes sont de deux types. Le premier type comprend les maladies qui affectent les parties de la plante en contact avec le sol, tels que les racines, la partie basse de la tige, les tubercules, les semences et les fruits qui touchent le sol ; c'est le cas de l'espèce *Pythium* et de certains espèces de *Phytophthora*, particulièrement *P. megakarya*. Le deuxième type de

maladies causé par les Oomycètes comprend les maladies qui affectent seulement ou principalement les parties aériennes de la plante, particulièrement les feuilles, les jeunes tiges et les fruits ; ces maladies sont causées par certaines espèces de *Phytophthora*. Les trois espèces de *phytophthora* les plus importantes dans le monde entier et causant la pourriture brune des cabosses sont: *P. Palmivora* ; *P. megakarya* ; *P. capsici*. En 1979, *P. megakarya* était identifié au Nigéria (Brasier & Griffin, 1979) et est maintenant devenu l'espèce pathogénique le plus prédominant en Afrique Centrale et de l'Ouest. *P. megakarya* se distingue clairement des deux autres espèces au niveau caryotypique (seulement 5 à 6 chromosomes contre 10 à 12) et isoenzymatique (Brasier & Griffin 1979).

I-3-1 Biologie de *Phytophthora megakarya*

. *Phytophthora megakarya* a été décrit en 1976 pour la première fois sous la base du nombre de chromosomes, les caractéristiques des sporanges et le nombre de pédicelles comme nouvelle espèces sur *Theobroma cacao* en Afrique de l'ouest (Brasier & Griffin 1979). Les *Phytophthora* sont des organismes diploïdes pouvant se multiplier par voie sexuée ou asexuée (Attard *et al.* 2008). Pour ce qui est de la reproduction sexuée, certaines espèces comme *P. sojae*, *P. heveae* et *P. katsurae* sont homothalliques, tandis que d'autres telles *P. infestans*, *P. palmivora*, *P. nicotianae* et *P. capsici* sont hétérothalliques. Ces dernières requièrent la présence de deux thalles complémentaires et de types sexuels opposés pour se reproduire. La formation subséquente de gamétanges mâle (anthéridie) et femelle (oogone) constitue l'unique phase haploïde, et elle est sous le contrôle des hormones Mat (Harutyunyan *et al.* 2008). La fusion des gamètes en présence de stéroïdes produit des oospores qui sont des structures à parois épaisses, capables dans la nature de résister aux conditions extrêmes et à l'absence prolongée d'hôte. *P. megakarya* est hétérothallique et capable de reproduction sexuée *in vitro* (Förster *et al.* 1990). Cependant, des oospores n'ont jamais été observées dans la nature sur cacaoyer. L'on suppose donc qu'il n'y a pas de reproduction sexuée chez *P. megakarya* en champ.

La reproduction asexuée quant à elle consiste en la production de zoospores qui jouent un rôle prépondérant dans le pouvoir pathogène des *Phytophthora*. Certaines espèces dont fait partie *P. megakarya* produisent également des chlamydospores à parois épaisses qui sont des structures de conservation dans le sol et les débris végétaux lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (Erwin & Ribeiro 1996). Chez *P. megakarya*, lorsque les conditions deviennent favorables, l'on note une prolifération de sporanges et la

libération de zoospores en présence d'eau libre. Les zoospores nagent ensuite par chimiotactisme à la surface de l'eau vers les organes à infecter, pendant une période variant de quelques minutes à plusieurs heures (en fonction de la température et du pH du milieu), puis ils s'encystent (Erwin & Ribeiro 1996) Trente minutes après encystement, la germination se produit et l'hyphe pénètre les tissus de l'hôte dans les 48h par temps très humide, marquant ainsi le début du processus infectieux. Les deux modes de reproduction sont représentés ci-dessous (Figure 7).

Cycle de développement de *Phytophthora megakarya*

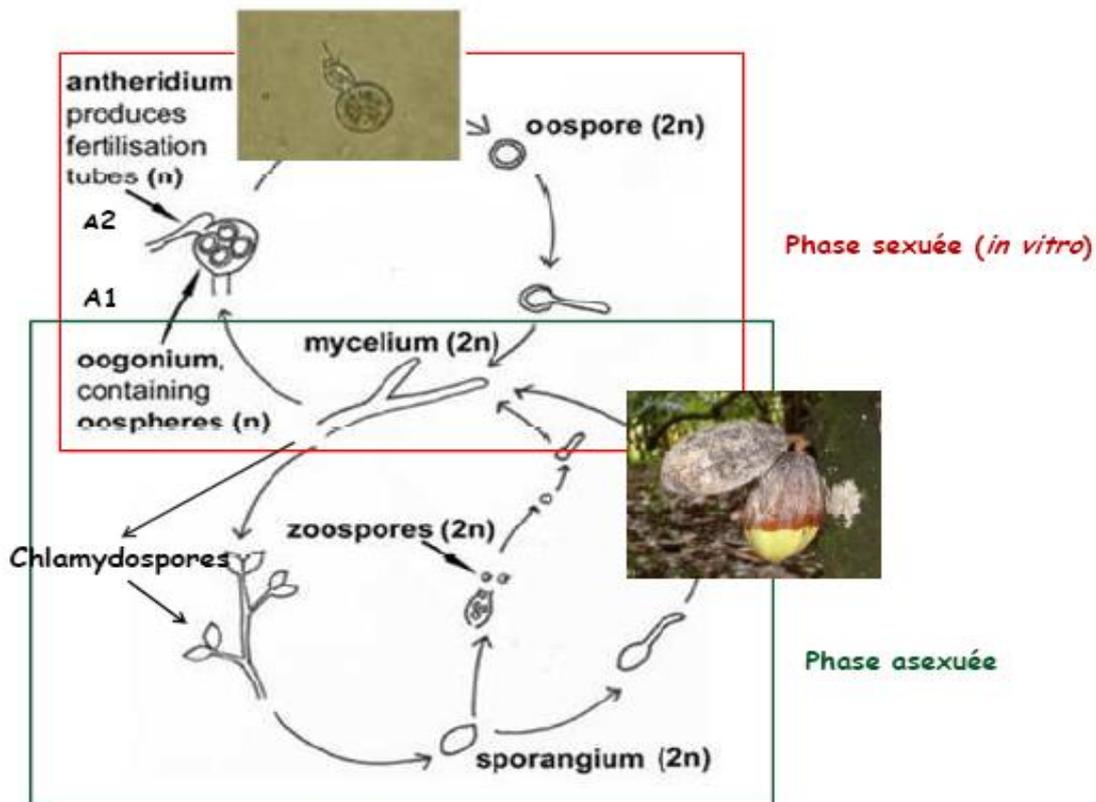


Figure 7 Cycle de reproduction des Phytophthora.

L'encadré vert représente la phase asexuée. La photographie montre des sporocystes (blanchâtres) couvrant les taches brunes à la surface des cabosses infectées. L'encadré rouge représente la phase sexuée du cycle. La photographie montre une oospore (Mfegeu 2012).

I-3-2 Taxonomie et distribution de *Phytophthora megakarya*

Le *Phytophthora* est un genre d'oomycète à l'aspect morphologique de champignon. Mais sa biologie (métabolisme en particulier) est très différente, touchant les plantes cultivées telles la pomme de terre et arbres (exemple le cacaoyer). La confusion taxonomique des Oomycètes avec les champignons phytopathogènes (true fungi) a entraîné

un retard dans l'acquisition des connaissances sur ce phytopathogène majeur. Les Oomycètes ne sont pas apparentés à ces derniers mais plutôt aux algues photosynthétiques (Förster *et al.* 1990). Systématiquement Cordier Tristan (2007) décrit la taxonomie de *Phytophthora megakarya* comme suit :

Règne:	Eucaryotes
Lignée :	Stramenophile
Classe:	Oomycètes
Ordre:	Péronosporales
Famille:	Péronosporacées
Genre:	<i>Phytophthora</i>
Espèce:	<i>Phytophthora megakarya</i>

Phytophthora megakarya est l'un des agents pathogènes de la classe des Oomycètes identifié sur *Theobroma cacao*, c'est le plus virulent du genre *Phytophthora* qui est responsable de la maladie de la pourriture brune. Le premier signalement de la pourriture brune en Afrique a eu lieu en 1906 dans les plantations cacaoyères nouvellement installées au pied du Mont Cameroun. Des dégâts de l'ordre de 40% soit 2 à 3 fois le niveau de perte généralement observées avec *P. palmivora* y ont été rapportés cette année-là (Geschiere & Konings 1912). La maladie sera ensuite signalée dans les plantations de Bipindi - Lolodorf (zone Littoral) en 1915, bien qu'elle ait pu être présente dès 1906. *Phytophthora megakarya* avait été identifié pour la première fois comme agent causal de la maladie de la cosse noire en 1979 après la reclassification de l'espèce *Phytophthora* récupérée de tissus infectés de cacaoyers. Le pathogène cause la pourriture de la cosse, qui est aussi appelée la maladie de la cosse noire de *T. cacao*, cette maladie est seulement endémique en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale. *Phytophthora megakarya* s'est développé dans le sens Ouest partant du Cameroun en passant par le Nigeria et le Togo, pour aller dans les grands pays producteurs du cacao comme le Ghana et la Côte d'Ivoire ; il s'est aussi développé vers le Sud au Gabon et en Guinée Equatoriale. La menace exercée par *P. megakarya* sur le cacao est un problème pour les producteurs de cacao et les scientifiques, mais les mécanismes de survenue de *P. megakarya* sur le cacao demeurent inconnus (Akrofi 2015). *Phytophthora megakarya*

présent en Afrique central et de l'ouest est devenu le principal facteur limitant la production cacaoyère des surfaces affectées (Opoku *et al.* 2000), dépassant rapidement *P. palmivora*. Dans les conditions de pluviosité fréquente et élevée au Cameroun, *P. megakarya* peut causer les pertes de rendement jusqu'à 100% lorsque aucune mesure de contrôle n'est prise (Despreaux *et al.* 1988). Au Ghana, les pertes comprises entre 60 et 100% ont été notées (Dakwa 1987).

I-3-3 Interaction *Phytophthora-Theobroma cacao* L.

La pourriture brune des cabosses causée par *P. megakarya* a été reconnue comme étant la première maladie fongique affectant la production cacaoyère au Cameroun (Nyassé 1992). Les pertes économiques les plus importantes proviennent de l'infection des cabosses. Ces dernières peuvent l'être à tout âge, mais les pertes économiques les plus significatives sont dues à l'infection durant les deux mois précédant la maturation des cabosses. Les cabosses infectées à cet âge peuvent être totalement perdues, à cause du fait que le pathogène passe plus facilement de l'enveloppe de la cabosse à celle de la graine (Figure 8c).

L'apparition des spores se présente sous la forme d'une couche jaune/blanche, qui devient plus dense au fur et à mesure que la maladie progresse (Figure 8b). Les spores sont enlevées par les gouttes d'eau de pluie qui frappent la surface de la cabosse, elles infectent ainsi les autres parties du cacaoyer (tige, coussinets floraux et les gourmands). La pourriture brune est très difficile à contrôler car les zoospores de *Phytophthora* viables peuvent vivre en tas amassées dans l'enveloppe des cabosses pendant plus de trois mois. De plus les insectes particulièrement les termites, sont des agents de dissémination des *Phytophthora*. L'observation des champs de cacao montre qu'il existe une différence dans le niveau d'infection des cultivars et qu'aucune des sélections n'a montré une immunité totale. Deux types de résistance existeraient : l'une à la pénétration de la cabosse par le pathogène et l'autre à la croissance du pathogène après infection.



Figure 8 Cabosses de SNK16 infectées par *Phytophthora megakarya* [(A) attaque apicale; (B) attaque distale; (C) forme momifiée] (Ondobo 2014).

I-4 Généralités sur *Pythium myriotylum*

Le genre *Pythium* est un oomycètes dont la plupart de ses espèces sont parasites des plantes, mais *Pythium insidiosum* est un important parasite des animaux. Ils ont été classés comme des champignons. Les espèces *Pythium* sont des pathogènes dont le foyer primaire est le sol ; ils sont plus importants dans leur habileté à infecter une grande variété de plantes, avec des infections le plus souvent résultant des dommages pré- ou post-émergence semencières, pourritures racinaire. *Pythium myriotylum* Drechs n'est pas exempt à la règle. *P. myriotylum* est rencontré le plus souvent seul ou avec d'autres espèces *Pythium* en serre où ils influent sur l'augmentation de la densité des plantes et les conditions environnementales ; favorisant ainsi le développement de la maladie. L'étude de la symptomatologie de la maladie causée par *Pythium myriotylum* Drechs chez le macabo permet de distinguer trois catégories d'anomalies dont la plus grave est «La Pourriture racinaire» suivie d'un jaunissement précoce des feuilles avec ou sans nanisme. La production de tubercules peut être nulle quand les attaques sont sévères. *Pythium myriotylum* Drechs (Oomycète, Stramenophile) est un phytopathogènes nécrotrophe causant des pertes économiques significatives dans plusieurs récoltes.

I-4-1 Biologie de *Pythium myriotylum*

Les espèces *Pythium* se rencontrent à travers le monde et sont communément en association avec les racines des plantes et d'autres parties de la plante en contact avec ou à proximité du sol. Lorsque les conditions environnementales sont favorables pour ces organismes et défavorables pour la plante, l'infection de la plante peut se produire. Ces infections comme d'habitudes se produisent au niveau des racines, des tiges basses et des

fruits proches ou en contact avec le sol, et les tissus mous des plantes qui existent généralement dans les semences des plantes. Les espèces *Pythium* qui ne parasitent pas les plantes causent des maladies chez le poisson, les crustacées et aussi chez d'autres espèces *Pythium* (Tom & Dave 2000).

Généralement les espèces *Pythium* sont composées de fins filaments microscopiques appelés hyphes. L'ensemble de ces hyphes est appelé mycélium et est de couleur blanche. Parfois, une large colonie mycélaire peut croître sur des tissus infectés. Une colonie de mycélium peut croître à plus d'un centimètre par jour lorsque prévalent les conditions humides et chaudes (Tom & Dave 2000).

La multiplication des espèces *Pythium* se fait par croissance des hyphes et production des spores microscopiques. Quatre types de spores sont produits : les sporanges, les zoospores, les oospores et les chlamydospores. Les chlamydospores sont formes des segments d'hyphes très épais. Les sporanges peuvent germer pour former de nouveaux hyphes, mais généralement le rôle des sporanges dans le cycle de la maladie est de produire les vésicules dans lesquelles les zoospores sont formées. Les zoospores sont fragiles, ils produisent de manière asexuée les spores dépourvues de paroi cellulaire et possèdent deux flagelles qui propulsent l'organisme dans l'eau. L'eau est nécessaire pour la production des sporanges, des vésicules et des zoospores (Tom & Dave 2000).

L'oospore se forme après le croisement des portions mâle et femelle du thalle. La plupart des espèces de *Pythium* sont hermaphrodites. Bien que les oospores soient le résultat d'un croisement sexué, l'organisme a un mécanisme de recombinaison des gènes pour augmenter les variations à l'intérieur des espèces. Egalement, les oospores fournissent une méthode efficace de suivi des espèces *Pythium* parce qu'ils ont généralement une paroi très épaisse. Les oospores survivent dans les débris de récoltes tels que les racines et les tiges décomposées qui ont été infectées précocement. Ils oospores ont une durée de vie extrêmement longue et peuvent survivent pendant plus de 10 ans (Tom & Dave 2000).

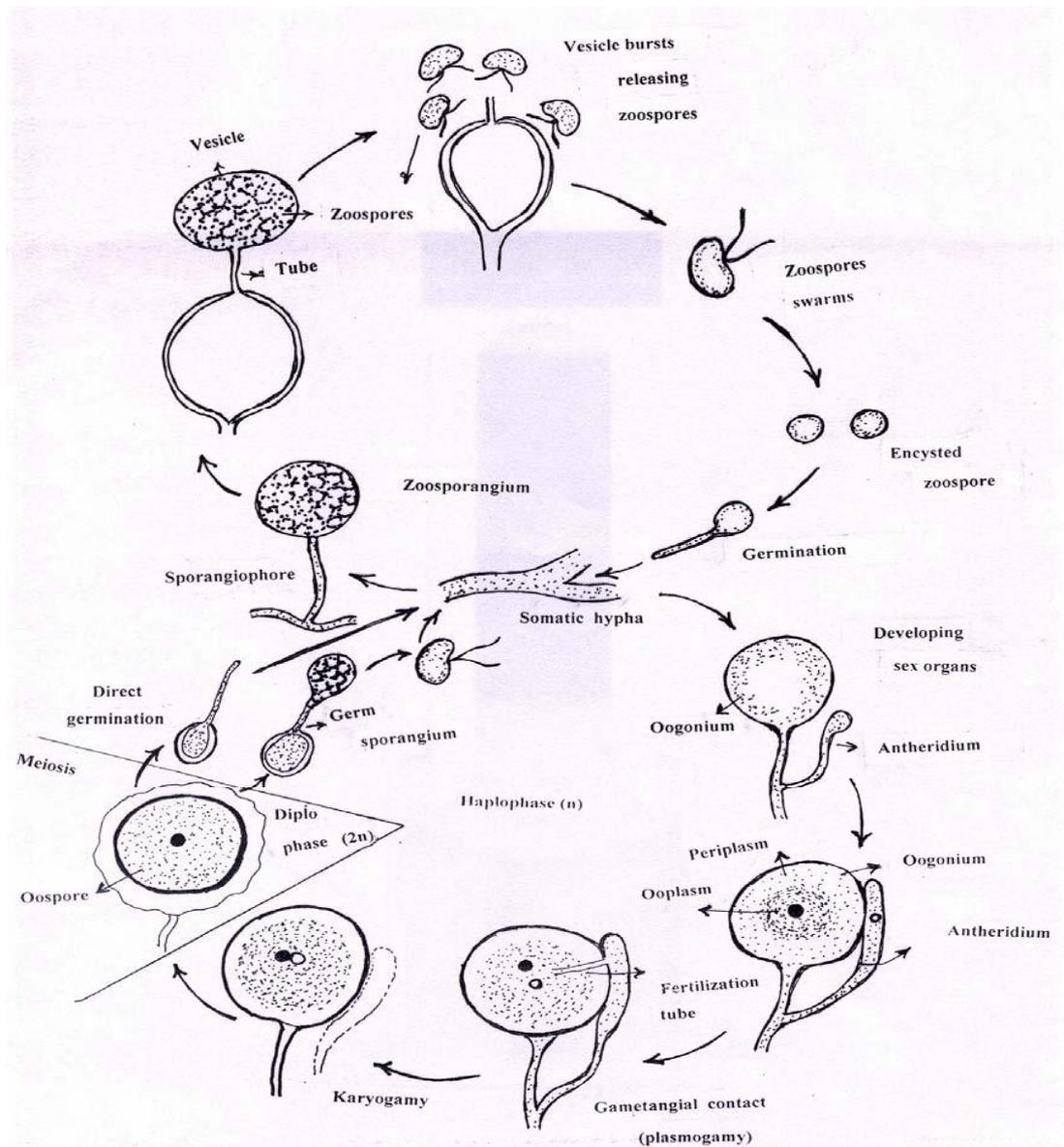


Figure 9 Cycle biologique de *Pythium sp.* (Bagyaraj & Arpana 2006)

I-4-2- Taxonomie et distribution de *Pythium myriotylum*

Pythium myriotylum Drechs est présent dans toutes les régions chaudes du monde avec une très large gamme d'hôtes. Selon Farr *et al* (2007), ce pathogène a été retrouvé sur 79 plantes hôtes des genres tels que: *Antirrhinum*, *Aponogeton*, *Arachis*, *Caladium*, *Citrullus*, *Coronilla*, *Cucumis*, *Glycine*, *Ligustrum*, *Lolium*, *Peperomia*, *Phaseolus*, *Robinia*, *Solanum*, et *Triticum*. Ce pathogène est responsable des pertes économiques chez la tomate, arrachides, tabac et le macabo (*Xanthosoma sagittifolium*). Systématiquement Cordier Tristan (2007) décrit la taxonomie de *Pythium myriotylum* comme suit :

Règne:	Eucaryotes
Lignée :	Stramenophile
Classe:	Oomycètes
Ordre:	Pythiales
Famille:	Pythiacées
Genre:	<i>Pythium</i>
Espèce:	<i>Pythium. myriotylum</i>

Au Cameroun, il est assez difficile de situer la période exacte de l'apparition de la maladie. Pour la plupart des auteurs (Nzietchueng 1983), les débuts de la maladie remontent vers les années 70. Dans les zones de grande culture, la maladie, à laquelle les paysans avaient donné le nom d' « Appollo » semble présente depuis 1969. La pourriture racinaire du macabo prédomine dans les zones forestières (départements du Nyong et Kellé, Sanaga Maritime, Nkam. Mungo, Fako et Memé). Ces départements correspondent aux zones avec des températures moyennes de 22 à 27 °C (juin-octobre) et une pluviométrie moyenne d'environ $1,8 \times 10^3$ mm (Nzietchueng 1983).

Dans les zones forestières du Cameroun où sévit la pourriture racinaire du macabo, les températures enregistrées de juillet à octobre sont comprises entre 18 et 34°C. Dans la région des hauts plateaux de l'Ouest où la maladie est de faible importance, les températures enregistrées de juillet à octobre sont comprises entre 13 et 24°C. Les pH moyens des sols dans les grandes zones de culture du macabo au Cameroun sont supérieurs à 5,0. Seuls les sols ferrallitiques de l'Ouest ont un pH moyen inférieur à 5,0. Le pH optimum pour la croissance mycélienne du *P. myriotylum* est situé aux environs de 6,0 ; cette croissance est moyenne à pH 5,0 et faible pour les pH inférieurs à 5,0 (Nzietchueng 1983).

I-4-3- Interaction *Xanthosoma sagittifolium*-*Pythium myriotylum*

La pourriture racinaire du macabo (*Xanthosoma sagittifolium*) au Cameroun est une maladie causée par *Pythium myriotylum* elle est largement répandue dans les grandes zones de culture. Son incidence est directement dépendante de certains facteurs de l'environnement notamment les fortes pluviosités accompagnées de températures élevées. Les semences (tubercules) et le sol infestés constituent les principaux modes de propagation de la maladie.

Les fortes densités de semis accélèrent l'évolution de la pourriture racinaire (Nzietchueng 1983).

Ce champignon attaque les racines surtout en conditions de sol hydromorphe. Sur les parties aériennes on remarque au champ un flétrissement et un rabougrissement des feuilles, un raccourcissement des pétioles et une chlorose du limbe (couleur vert-jaune). Quand on coupe un corme atteint, les parties malades sont décolorées et molles avec une séparation marquée d'avec les zones saines qui restent bien blanches ou colorées selon le cultivar. Les racines saines sont de couleurs crèmes ou roses et bien turgescents alors que les malades sont sombres et flasques avant nécrose complète.

Les symptômes de la maladie se présentent au niveau du port végétatif sous deux faciès bien distincts: le nanisme et le jaunissement foliaire. Dans le cas de la forme aiguë, l'attaque est brutale. Les tubercules (semences) mis en terre peuvent ne pas germer, ou bien germer et végéter mal. Ce mauvais développement de la plante est lié à l'insuffisance des racines qui sont détruites par le parasite au fur et à mesure de leur émission. La maladie apparaît sous forme de foyers qui s'étendent de proche en proche. Ce faciès maladif est caractéristique des «fontes de semis» causées par les champignons telluriques. Dans le cas de la forme chronique, les symptômes de jaunissement des feuilles s'observent alors que les plantes sont solidement établies (trois mois environ après le «semis»). C'est de loin le faciès le plus commun. Le jaunissement commence par des ponctuations plus ou moins régulières sur les bordures du limbe qui devient chlorotique. Ensuite, la totalité du limbe se décolore, jaunit et sèche. La maladie apparaît sous forme de foyers qui s'étendent de proche en proche (Nzietchueng 1983).

La pourriture débute par l'extrémité des racines mais souvent les lésions peuvent apparaître n'importe où le long des racines. De coloration brun foncé au départ, elle vire ensuite au noir. La racine pourrie (pourriture molle) pressée entre les doigts présente un cylindre central intact ce qui laisse supposer que, dans les premières phases de l'infection, le parasite responsable serait un endophyte cortical à développement intercellulaire. En effet, *P. myriotylum* développe un mycélium inter et intracellulaire dans les tissus de l'hypocotyle du haricot (*Phaseolus sp.*) et secrète en milieu de culture des enzymes protéolytiques et pectinolytiques (pectine-méthylestérase) (Nzietchueng 1983).

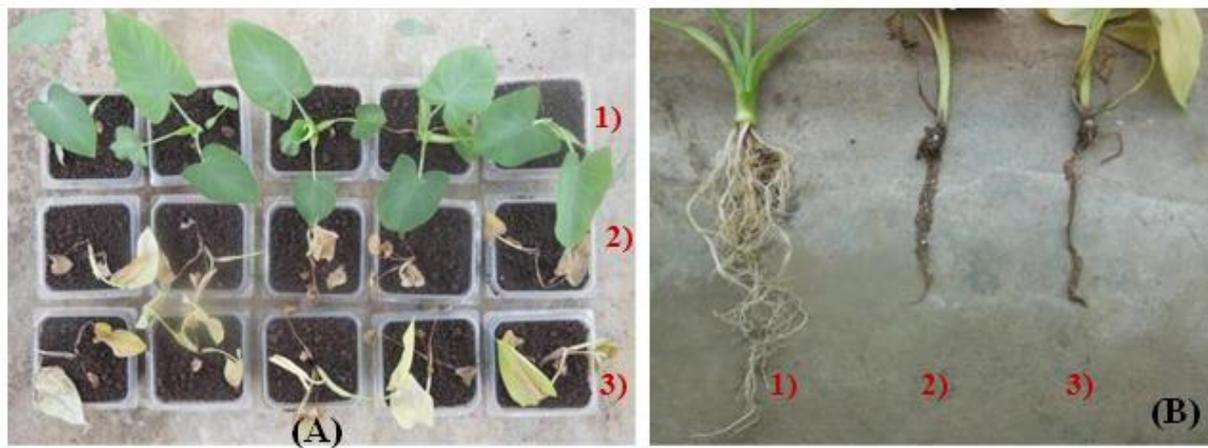


Figure 10 Expérience de pathogénicité avec utilisation de deux isolats de *Pythium myriotylum* (NGR02 and NGR03) sur les tissus de plante de macabo (*Xanthosoma sagittifolium*) en culture. (A) Brunissement et mort des feuilles de macabo (B) Nécroses ou pourriture des racines infectées. 1) control ; 2) plantes infectée par NGR02 ; 3) plantes infectées par NGR03 (Feyisara *et al.* 2014).

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

II-1 Matériel fongique

Le matériel fongique, constitué des souches de *Phytophthora megakarya* et *Pythium myriotylum* provenaient de la banque des souches du Laboratoire de Phytoprotection et de Valorisation des Ressources Végétales (LPVRV) du Centre Biotechnologique de Nkolbisson.



Figure 11 Souches de *Phytophthora megakarya* (A) et *Pythium myriotylum* (B) (Photo Manejio, 2016)

II-2- Culture fongique

❖ Entretien des souches sur milieu V8

L'entretien des souches s'est fait sur milieu V8. Le milieu a été autoclavé à 120°C pendant 20 minutes puis coulé dans les boîtes de pétri stériles. Les disques mycéliens de 5 mm de diamètre prélevés sur le front de croissance des cultures fongiques ont été transférés sous une hôte dans les boîtes de pétri contenant le milieu V8, et incubées à $26 \pm 1^\circ\text{C}$ dans l'obscurité. Six jours plus tard dix disques mycéliens de 5 mm de diamètre de chaque souche ont été prélevés et introduites chacun de manière aseptique dans un tube contenant 10 ml de solution physiologique (NaCl 9 ‰) stérile ; ensuite le tube a été fortement agité à l'aide d'un vortex à température ambiante pendant 15 min pour provoquer l'enkystement des zoospores. La solution obtenue est ensuite filtrée. Le filtrat contenant les spores de chaque souche a été

soumis à un comptage au microscope à l'aide d'une cellule de Neubauer et dilué pour obtenir une concentration de 1000 spores/ μ l.

❖ Culture sur milieu liquide (extrait de malt)

Pour chaque souche, nous disposons de 6 erlenmeyers de 500ml dans lesquels, pour chacun, une suspension sporale est préparée par inoculation de 300 μ l de spores dilués (1000spores/ μ l) dans 250ml d'extrait de malt, milieu de croissance. Ces suspensions sporale sont placées en agitation dans une enceinte obscure pour éviter l'éclatement des spores et les différentes biomasses fongiques sont collectées à 3 et 9 jours après inoculation. La collection de la biomasse fongique de chaque souche se fait au travers du papier filtre (20mm de diamètre), ensuite lavé deux fois avec de l'eau distillée stérile, puis peser pour déterminer la masse fraîche. Pour déterminer la masse fongique sèche, les masses myceliales sont lyophilisées et repeser lorsqu'elles sont complètement sèches

II-3- Extraction et isolement de la paroi totale

L'extraction de la paroi totale est réalisée selon le protocole de Cantu *et al.* (2009). Chez *P. megakarya*, 0,65g (jour 3) et 1,2g (jour 9) et chez *P. myriotylum* 0,9g (jour 3) et 2,01g (jour 9) de mycélium sèche sont placés dans 100ml d'éthanol à 100%, ensuite homogénéisés et bouilli pendant 45min pour extraire les solutés de faible poids moléculaire et empêcher l'autolyse, car l'ébullition inactive les enzymes digestives de la paroi. La fraction insoluble (culot) est filtrée sous vide à travers le papier Whatman (glass-fiber paper GF/C) et lavée séquentiellement avec 200ml de mélange méthanol : chloroforme (1 :1, v/v) et 200ml d'acétone donnant ainsi la paroi totale (fraction insoluble dans l'alcool (AIS)) qui est ensuite séché toute la nuit à 37°C.

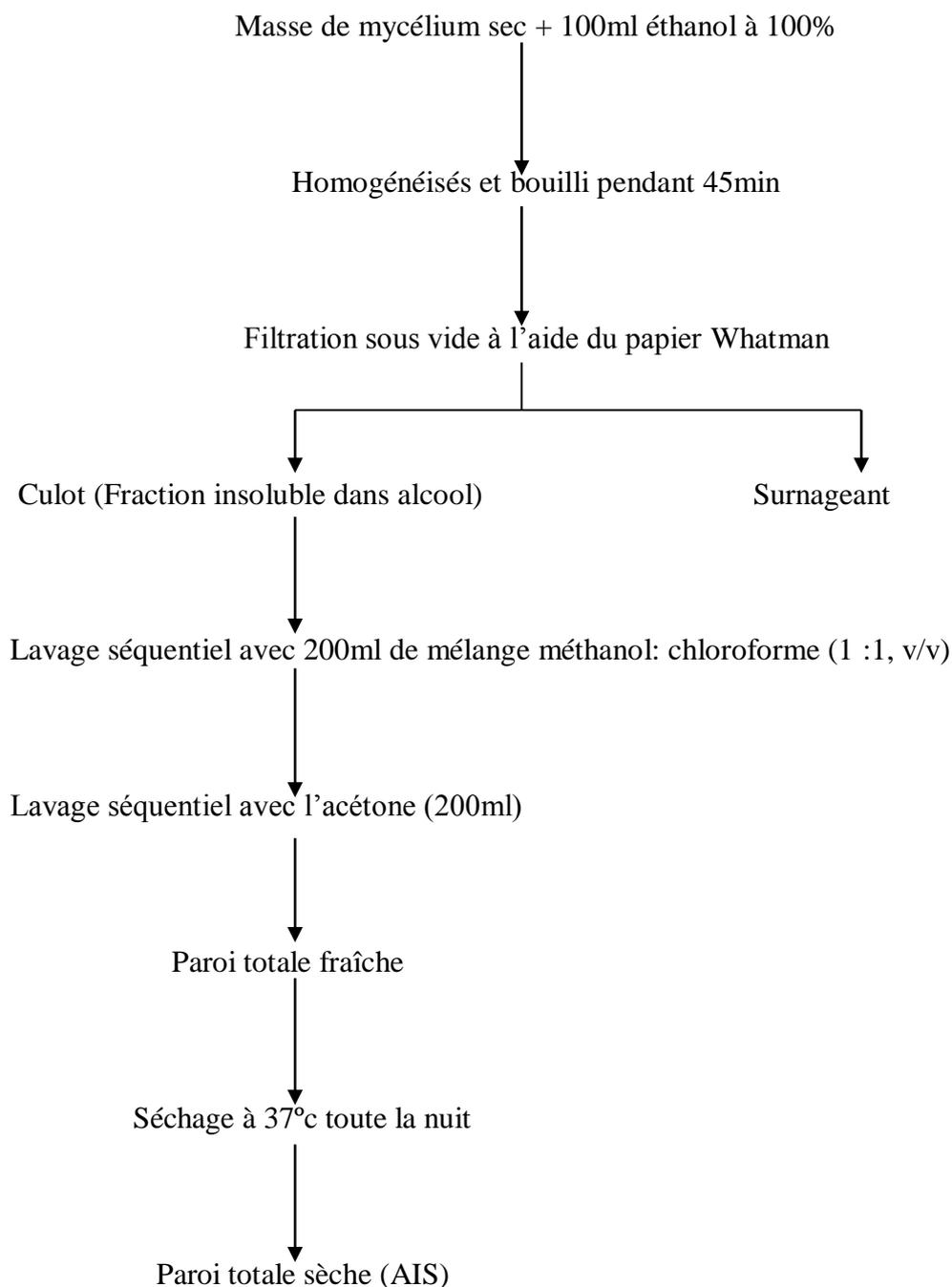


Figure 12 Protocole d'extraction de la paroi totale (Cantu *et al.* 2009)

II-3-1- Fractionnement de la paroi total

0,2g de paroi totale de chaque souche sont placés dans du NaOH 1N puis chauffé à 65°C pendant 30min pour l'extraction de la fraction alcaline (ALS). Le culot obtenu après centrifugation à 6000g pendant 20min a été suspendu dans du NaOH 1N puis chauffé à 65°C pendant 30min, puis centrifugé à 6000g pendant 20min. Les surnageants 1 et 2 constituent la fraction alcaline de la paroi (ALS) tandis que le culot constitue la fraction insoluble dans le

NaOH (ALI). La fraction alcaline a été ensuite filtrée à travers le papier Whatman (glass-fiber paper GF/C) et dialysée dans le Tris-HCl pH 7 à 4°C à l'aide d'une membrane de dialyse de 6000-8000MWCO. Le culot insoluble a été lavé cinq fois avec de l'eau distillée. Les fractions alcaline et insoluble sont lyophilisées et pesées. L'extraction des fractions totales (AIS) a été réalisée pour chaque essai (3 et 9 jours) et chaque fraction a servi à l'extraction des deux fractions alcalines.

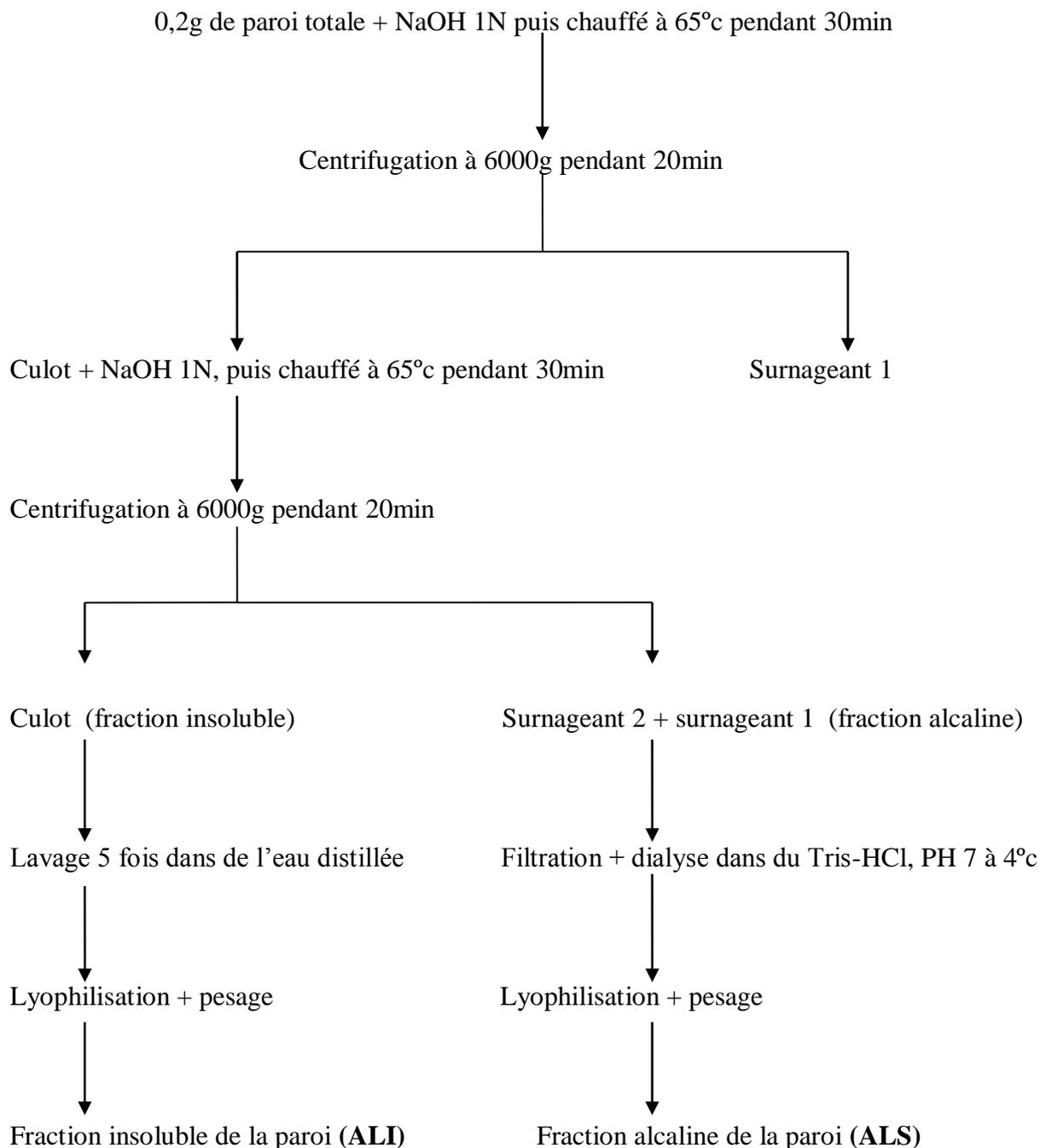


Figure 13 Protocole de fractionnement de la paroi totale d'après Cantu *et al.* (2009).

II-3-2- Composition monosaccharidique des fractions (AIS, ALS et ALI) de *Phytophthora megakarya* et *Pythium myriotylum*

La composition monosaccharidique a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) selon la méthode de York *et al.* (1985a).

Principe

C'est une technique qui permet la séparation et l'identification des molécules d'un mélange gazeux susceptible d'être vaporisé par chauffage. Ainsi, elle repose sur le phénomène d'adsorption où les molécules à séparer sont soumises à une force de rétention par la phase stationnaire solide et à une force d'entraînement par la phase gazeuse. L'équilibre résultant aboutissant à la migration différentielle des molécules de l'échantillon à analyser et de ce fait à leur séparation.

Mode opératoire

a) Préparation de l'échantillon

Les échantillons ont été hydrolysés avant chaque analyse selon la méthode de Ray *et al.* (2004): Ainsi,

- Deux (2) mg d'extraits ont été hydrolysés dans 1 mL de TFA 4 N pendant 2 h à 110°C;
- Un (1) mg/mL d'inositol a été ajouté comme standard interne à ces solutions avant l'hydrolyse;
- Après 10min de centrifugation à 5000 g, les différents surnageants ont été prélevés puis lyophilisés;
- Les monosaccharides présents dans l'hydrolysate ont été traités pendant 16 heures à 80°C avec 0,5 ml de méthanol/HCl 1 M (Kit méthanolique-HCl 3 N de Supelco, Bellefonte, USA). Ce traitement permettait de convertir les monosaccharides présents en leurs glycosyls de méthyle correspondants et les acides uroniques en esters de méthyle, rendant ainsi les polysaccharides volatils;
- Les échantillons ont été évaporés sous flux d'air à 40°C et lavés ensuite deux fois avec 250 mL de méthanol anhydre avant d'être évaporés à nouveau;
- Deux cents (200) µL de réactif de silylation (Kit HMDS+ TMCS+ pyridine, 3/1/9, Supelco, Bellefonte, USA) ont été ajoutés aux échantillons;

- Le mélange a été chauffé pendant 20 mn à 80 °C, dans le but de dériver les glycosides en triméthylsilyl glucosides;
- Le réactif de silylation a été évaporé sous l'air comprimé à 40°C puis les échantillons ont été solubilisés dans 1,5 mL de cyclohexane;
- Par la suite, 1 mL de cette solution a été déposé dans les microtubes.

b) Chromatographie en phase gazeuse suivant le protocole de York *et al.* (1985a)

- Un (1) µL d'échantillon a été prélevé et injecté dans la colonne dans le but de déterminer sa composition en monosaccharide;
- Les dérivés triméthylsilylés séparés et volatilisés dans la colonne ont été détectés par ionisation de flamme chauffée à 250°C et 280°C;
- La colonne traversée par le flux d'hélium a été équilibrée à la température initiale du programme (120°C);
- Après injection, la température du four au niveau de la colonne augmentait graduellement de 10°C/min à 160°C, puis de 15°C/min à 220°C et enfin de 20°C/min à 280°C, qui représentait la température à laquelle elle se stabilise. La colonne fut refroidie à 120°C à la fin du cycle;
- Les aires de dérivés triméthylsilylés de chaque monosaccharide ont été intégrées à l'aide d'un intégrateur STAR Workstation Varian 5.52 et additionnées afin d'établir la composition glycosidique relative de la fraction dérivée;
- Un mélange équimolaire (2 mg/mL) de monosaccharide standard contenant les oses consécutifs de la paroi (arabinose, xylose, acide glucuronique, rhamnose, fucose, mannose, galactose et glucose) et 50 µL du témoin interne inositol (1mg/mL) a été utilisé pour la quantification des oses. Les résultats obtenus pour chaque ose ont été exprimés en pourcentage relatif par rapport à l'ensemble des monosaccharides détectés.

NB: Cette analyse a été effectuée à l'Université de Rouen en France.

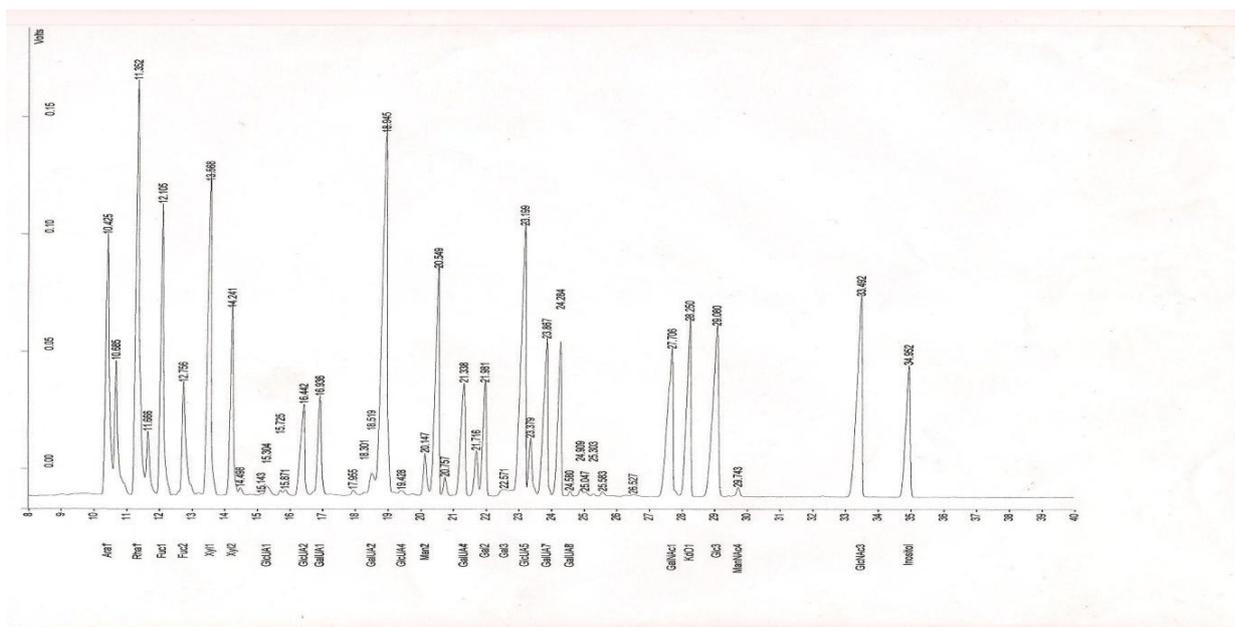


Figure 14 Chromatogramme (CPG) standard des oses majoritaires de la paroi analysés en quantités équimolaires. Les chiffres au dessus des pics représentent le temps de rétention de chaque sucre. T° initiale= 120°C ; T° de stabilisation= 280°C ; Gaz vecteur = Hélium ;

Tableau 1 Tableau récapitulatif des temps de rétention, exprimés en minutes (min), des glycosides de méthyle correspondant aux oses standards rencontrés majoritairement dans la paroi.

Oses	Temps de rétention (min)	Oses	Temps de rétention (min)
Arabinose	10,8	Acide galacturonique	17,50
	11,08		19,14
Rhamnose	11,72		21,92
Fucose	12,52		22,35
	13,23		25,31
Mannose	19,44	galactose	19,63
Acide glucuronique	16,86		21,13
			21,43
		22,63	
Acide glucuronique	24,03	Glucose	23,77
			24,93
		Inositol (témoin)	35,84

II-3-3 Analyses statistiques

Le tableur Excel 2007 a été utilisé pour le traitement des données et le tracé des graphes. Les données ont été analysées avec le logiciel SPSS version 17.0 et exprimés en moyenne \pm écart-type. Les moyennes ont été comparées en utilisant le test Tukey. A $p \leq 0,05$, la différence est considérée comme significative.

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

III-1 RESULTATS

III-1-1 Culture fongique et collecte des masses mycélares

Les masses mycélares fongiques de *Phytophthora megakarya* et *Pythium myriotylum* ont été collectées au troisième jour et neuvième jour de culture après inoculation de 300µl de spores dilués (1000spores/µl) dans 250ml d'extrait de malt. La quantité de masse mycélaire obtenue varie en fonction du nombre de jours de cultures. Chez *Phytophthora megakarya*, cette masse varie significativement de 0,99±0,08g de mycélium frais; soit 0,22±0,02g de mycélium sec au jour 3 à 1,53±0,53g de mycélium frais soit 0,4±0,12g de mycélium sec au jour 9. Chez *Pythium myriotylum* elle varie de 2,23±0,39g de mycélium frais ; soit 0,45±0,07g de mycélium sec au jour 3 à 2,59±0,22g de mycélium frais; soit 0,67±0,05g de mycélium sec au jour 9. Les masses obtenues au jour 3 et 9 de chez *Phytophthora megakarya* sont significativement inférieurs de celles obtenues chez *Pythium myriotylum* (Figures 15A et 15B). D'où le milieu MBM (extrait de malt) est plus favorable à la croissance mycélaire de *Pythium myriotylum* que celle de *Phytophthora megakarya*.

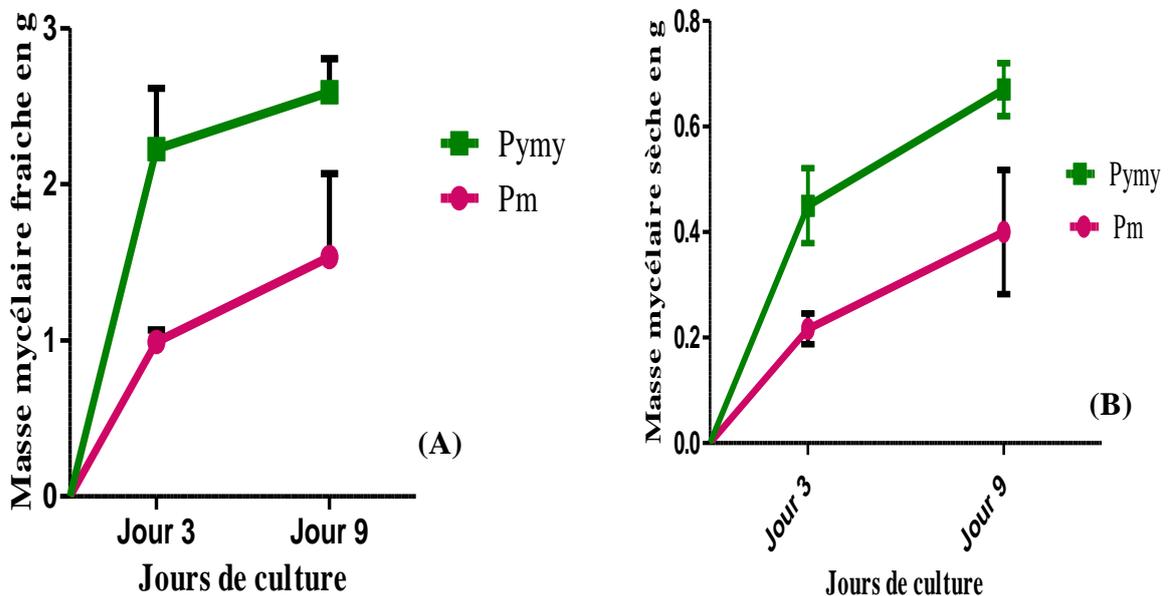


Figure 15 Evolution des masses mycélares fongiques en fonction du temps de culture (A) masse fraîche ; (B) masse sèche.

III-1-2 Rendement d'extraction et fractionnement de la paroi cellulaire fongique

Les rendements d'extraction et de fractionnement de la paroi cellulaire réalisés selon le protocole de Cantu *et al.* (2009) chez les deux oomycètes sont consignés dans le tableau suivant.

Tableau 2 Rendements de fractionnement de la matrice extracellulaire fongique

Différentes fractions	<i>Pythium myriotylum</i>		<i>Phytophthora megakarya</i>	
	Jour 3	Jour 9	Jour 3	Jour 9
AIS	76,67%	69,15%	76,92%	70%
ALS	25%	29%	25%	35%
ALI	28,5%	31%	34%	32,5%

III-1-2-1 Paroi totale (AIS)

Le rendement d'extraction de la paroi totale obtenue avec le Protocole de Cantu *et al.* (2009) ne varie pas entre les deux souches. Il varie en fonction du nombre de jours de culture pendant lesquels il baisse légèrement du 3^{ème} jour au 9^{ème} jour chez les deux souches. Chez *Pythium myriotylum* le rendement d'extraction passe de 76,67% au jour 3 à 69,15% au jour 9. Chez *Phytophthora megakarya* il passe de 76,92% au jour 3 à 70% au jour 9 (Tableau 2). L'analyse de la paroi totale chez les deux souches montre qu'il n'existe pas de différence significative entre les concentrations de ces parois au jour 3 et 9. Elle est légèrement élevée chez *Pythium myriotylum* ($4,125 \pm 0,170 \mu\text{mol/mg}$ au jour 3 et $4,175 \pm 0,05 \mu\text{mol/mg}$ au jour 9) que chez *Phytophthora megakarya* ($4,05 \pm 0,29 \mu\text{mol/mg}$ au jour 3 et $3,95 \pm 0,17 \mu\text{mol/mg}$ de matière sèche au jour 9) (Figure 16).

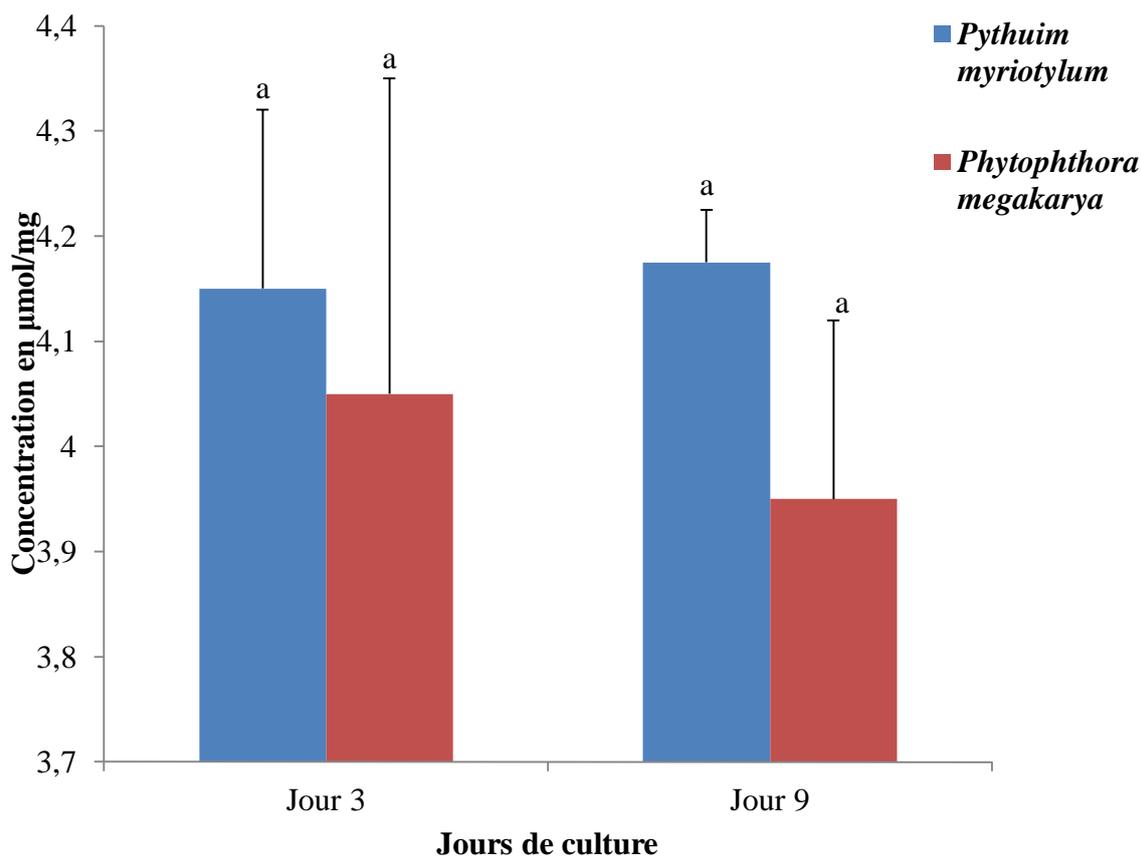


Figure 16 Variation de la concentration de la paroi totale (AIS) en fonction des jours de culture. *a pour les quantités AIS en fonction du temps.

III-1-2-2 Fraction soluble en milieu alcalin (ALS)

Le fractionnement de la paroi totale par le protocole de Cantu *et al.* (2009) a permis de constater que le rendement d'extraction de la fraction pariétale soluble en milieu alcalin (ALS) augmente en fonction du temps de culture chez les deux souches. Il passe de 25% au jour 3 à 29% au jour 9 chez *Pythium myriotylum* et de 25% au jour 3 à 35% au jour 9 chez *Phytophthora megakarya* (Tableau 2). L'analyse de cette fraction montre qu'elle est significativement plus élevée chez *Phytophthora megakarya* ($5,675 \pm 0,287 \mu\text{mol/mg}$ au jour 3 et $5,675 \pm 0,15 \mu\text{mol/mg}$ au jour 9) que chez *Pythium myriotylum* ($4,85 \pm 0,1 \mu\text{mol/mg}$ au jour 3 et $5,5 \pm 0,4 \mu\text{mol/mg}$ de paroi sèche au jour 9) et qu'elle ne varie pas en fonction du nombre de jours chez *Phytophthora megakarya* ; tandis qu'elle augmente significativement du jour 3 au jour 9 chez *Pythium myriotylum* (Figure 17).

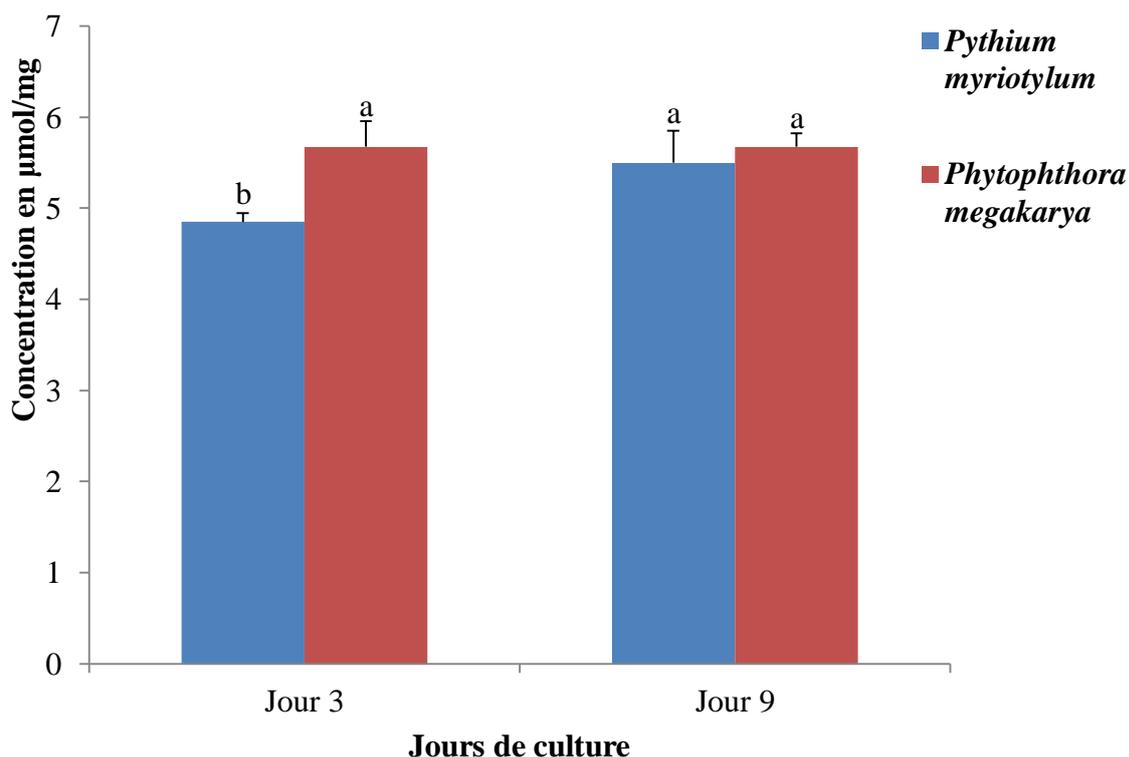


Figure 17 Variation de la concentration des fractions solubles en milieu alcalin (ALS) en fonction des jours de culture. *a> b pour les quantités ALS en fonction du temps.

III-1-2-3 Fraction insoluble en milieu alcalin (ALI)

Le fractionnement de la paroi totale d'après le protocole de *Cantu et al.* (2009) montre que le rendement d'extraction de la fraction pariétale insoluble en milieu alcalin augmente légèrement en fonction du temps de culture chez *Pythium myriotylum* (28,5% au jour 3 et 31% au jour 9), tandis qu'il diminue légèrement chez *Phytophthora megakarya* (34% au jour 3 et 32,5% au jour 9) (Tableau 2). L'analyse de cette fraction montre que sa concentration est légèrement élevée au jour 3 chez *Phytophthora megakarya* ($5,15 \pm 0,78 \mu\text{mol/mg}$ de paroi sèche) que chez *Pythium myriotylum* ($4,625 \pm 0,75 \mu\text{mol/mg}$ de paroi sèche). Par contre, au jour 9, la concentration d'ALI augmente légèrement chez *Pythium myriotylum* ($4,925 \pm 0,55 \mu\text{mol/mg}$ de paroi sèche), tandis qu'elle diminue chez *Phytophthora megakarya* ($4,5 \pm 0,99 \mu\text{mol/mg}$ de paroi sèche) (Figure 18).

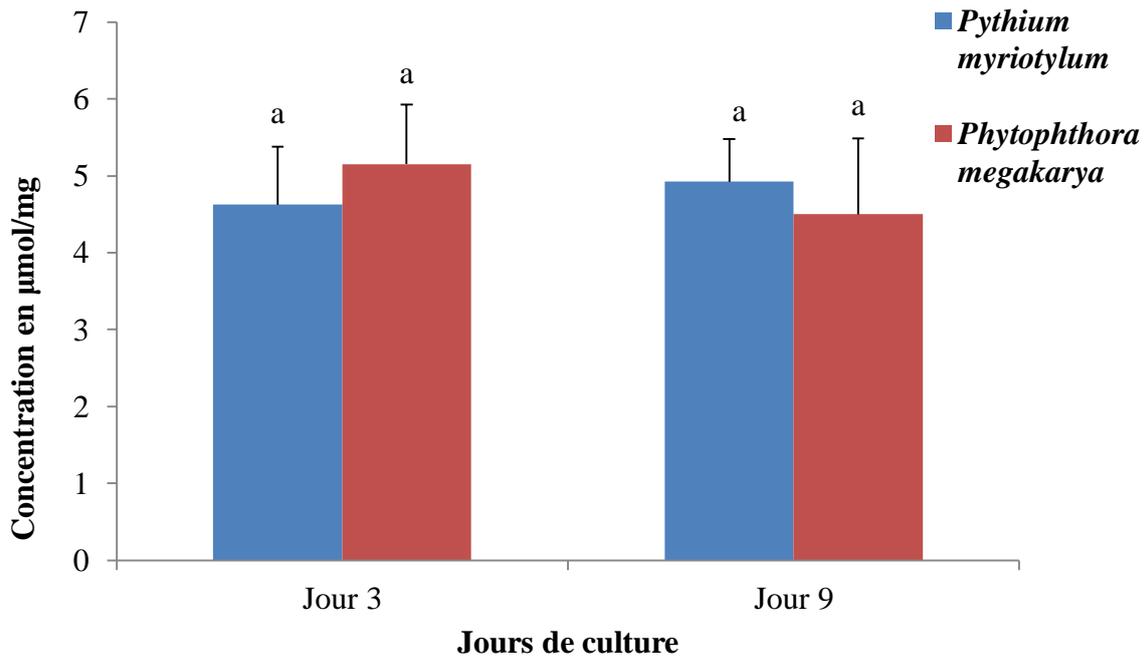


Figure 18 Variation de la concentration des fractions insolubles en milieu alcalin (ALI) en fonction des jours de culture. *a pour les quantités ALI en fonction du temps.

III-1-3 Analyse de la composition monosaccharidique des différentes fractions pariétales

III-1-3 -1 Analyse de la paroi totale (AIS)

L'analyse de la paroi totale extrait du mycélium des deux souches d'oomycètes (*Phytophthora megakarya* et *Pythium myriotylum*) à différents jours de leur croissance (jour 3 et jour 9) montre que le sucre ou monosaccharide majoritaire de leur paroi est le glucose, suivie du galactose et mannose. Le glucose augmente légèrement dans la paroi avec l'augmentation du nombre de jours de culture chez ces oomycètes. Chez *Phytophthora megakarya* sa teneur va de $63,20 \pm 0,41\%$ au jour 3 à $66,22 \pm 0,35\%$ au jour 9 tandis que chez *Pythium myriotylum* elle va de $58,95 \pm 1,22\%$ au jour 3 à $59,66 \pm 0,88\%$ au jour 9. Pour ce qui est du galactose et mannose, leur teneur baisse légèrement avec le temps. Chez *Pythium myriotylum*, leurs teneurs varient de $17,09 \pm 0,96\%$ au jour 3 à $16,40 \pm 1,01\%$ au jour 9 pour le galactose et de $13,10 \pm 0,36\%$ au jour 3 à $13,41 \pm 0,44\%$ au jour 9 pour le mannose ; tandis que chez *Phytophthora megakarya* elles varient de $14,14 \pm 0,38\%$ au jour 3 à $12,59 \pm 0,52\%$ au jour 9 pour le galactose et de $12,81 \pm 0,17\%$ au jour 3 à $12,33 \pm 0,16\%$ au jour 9 pour le mannose. On rencontre aussi au niveau de ces parois des sucres minoritaires tel que le N-acétylglucosamine (diminue légèrement de $4,82 \pm 0,38\%$ au jour 3 à $4,14 \pm 0,31\%$ au jour 9 chez *Phytophthora*

megakarya et augmente légèrement de $5,31\pm 0,61\%$ au jour 3 à $5,37\pm 0,27\%$ au jour 9 chez *Pythium myriotylum*), l'acide glucuronique et galacturonique, ainsi qu'une très faible proportion de xylose. Ces derniers en dehors de l'acide glucuronique diminuent légèrement avec le temps (Figure 19).

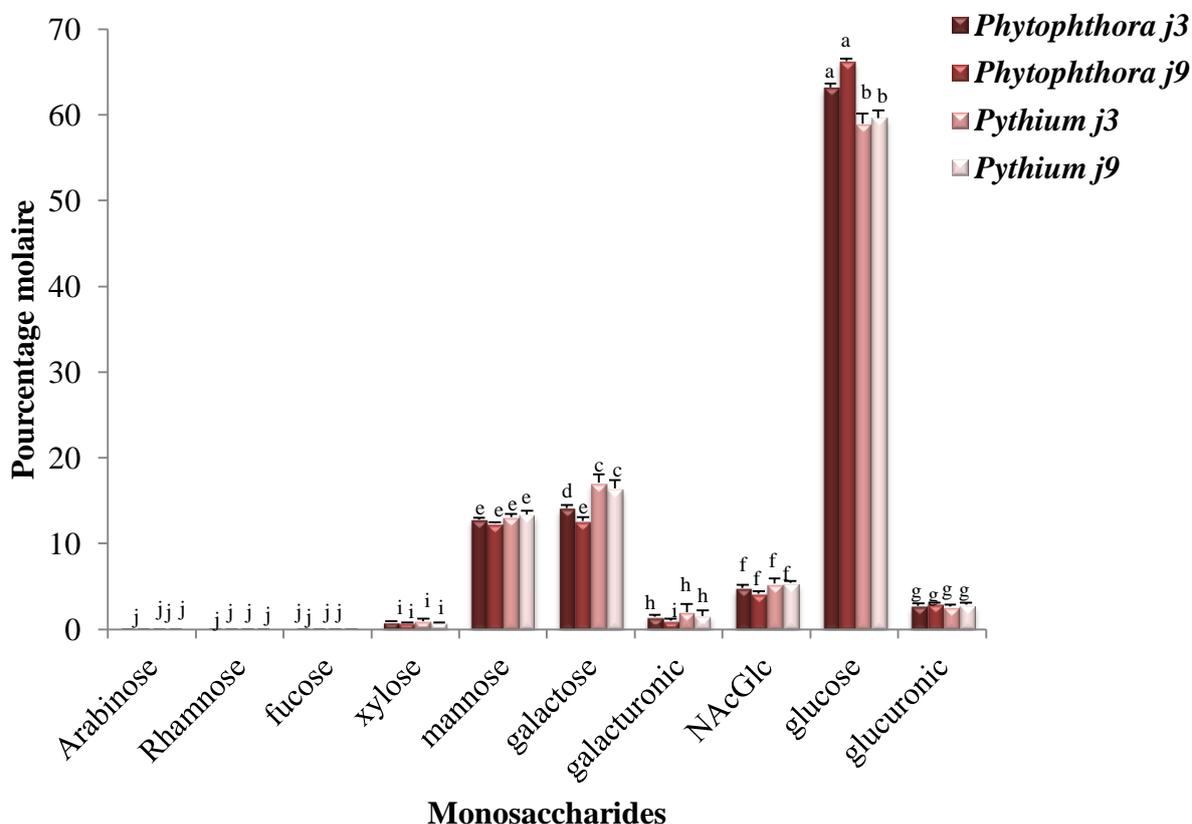


Figure 19 Composition en monosaccharides des parois totales (AIS) chez les deux souches. *a> b> c> d> e> f> g> h> i> j pour les pourcentages molaires en monosaccharides des différentes fractions pariétales.

III-1-3-2 Analyse de la fraction soluble en milieu alcalin (ALS)

L'analyse chromatographique de la fraction pariétale soluble en milieu alcalin montre que, comme la paroi totale, le monosaccharide majoritaire au sein de cette fraction chez ces deux oomycètes est le glucose, suivie du galactose et mannose. Le glucose diminue légèrement en fonction du temps de culture chez *Phytophthora megakarya* (de $57,02\pm 1,19\%$ au jour 3 à $56,06\pm 0,48\%$ au jour 9) tandis qu'il augmente chez *Pythium myriotylum* (de $49,51\pm 1,45\%$ au jour 3 à $52,58\pm 3,73\%$ au jour 9). Quant au galactose et mannose leur teneur diminue en fonction du temps de culture chez les deux souches ; excepté le cas du mannose chez *Pythium myriotylum* qui augmente. Pour ce qui est du galactose, sa teneur varie de $17,99\pm 0,50\%$ au jour 3 à $15,39\pm 0,38\%$ au jour 9 chez *Phytophthora megakarya* et de

20,71±0,32% au jour 3 à 21,65±0,50% au jour 9 chez *Pythium myriotylum*. Le mannose quant à lui varie de 12,90±0,71% au jour 3 à 12,62±0,43% au jour 9 chez *Phytophthora megakarya* et de 13,88±0,94% au jour 3 à 14,32±1,70% u jour 9 chez *Pythium myriotylum*. Hormis les sucres minoritaires (N-acétylglucosamine, acides glucuronique et galacturonique, xylose) rencontrés au niveau de la paroi totale, on rencontre aussi dans cette fraction de faible proportion de rhamnose dont la teneur est constante chez *Phytophthora megakarya* (3,80±0,28% au jour 3 et 3,80±0,11% au jour 9) et baisse chez *Pythium myriotylum* (4,21±0,28% au jour 3 et 3,06±2,05% au jour 9) (Figure 20).

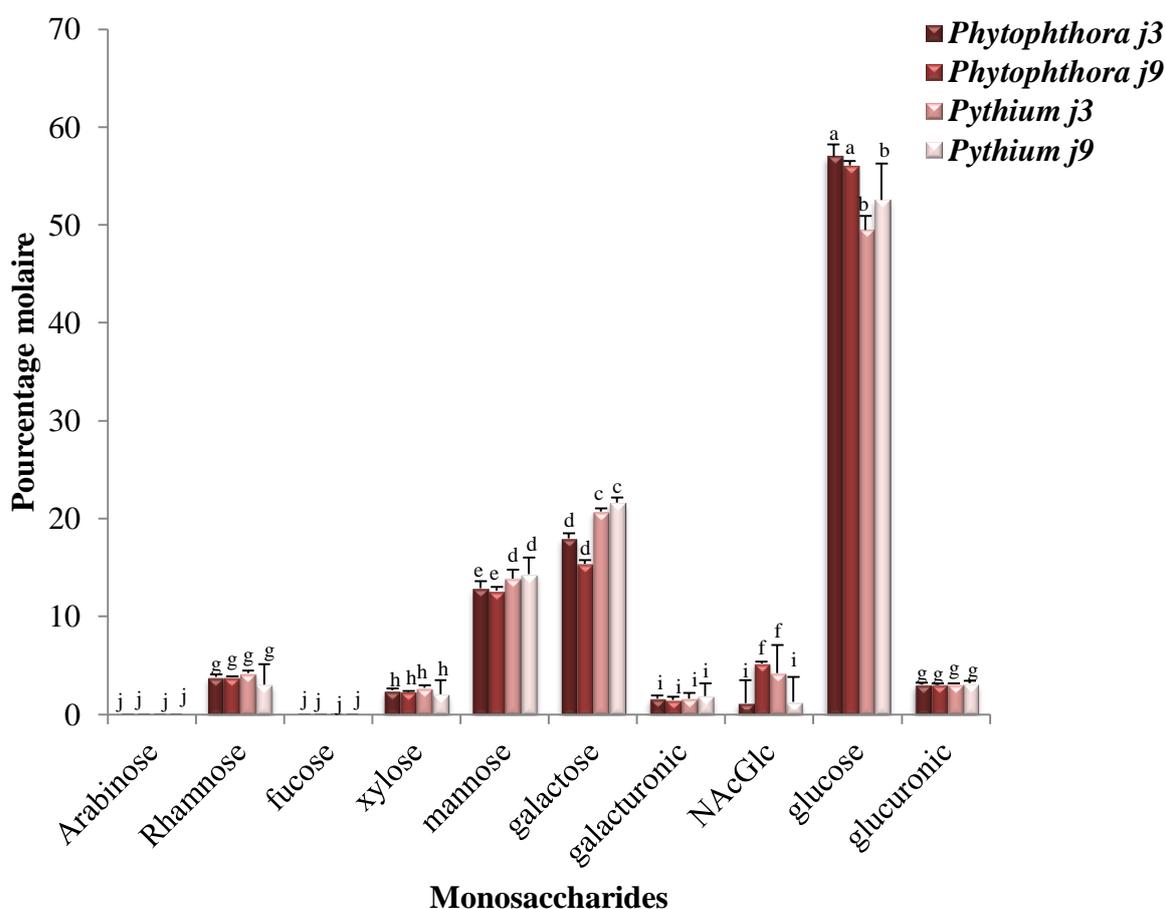


Figure 20 Composition en monosaccharides des fractions solubles en milieu alcalin (ALS) chez les deux souches. *a> b> c> d> e> f> g> h> i> j pour les pourcentages molaires en monosaccharides des différentes fractions pariétales

III-1-3-3 Analyse de la fraction insoluble en milieu alcalin (ALI)

L'analyse chromatographique de la fraction pariétale insoluble en milieu alcalin montre que le sucre majoritaire au sein de cette fraction chez les deux oomycètes est le glucose, suivie et galactose et du N-acétylglucosamine. Le glucose diminue en fonction du

temps de culture chez les deux souches. Chez *Phytophthora megakarya*, sa teneur passe de 70,93±1,30% au jour 3 à 68,87±2,05% au jour 9 et chez *Pythium myriotylum*, elle passe de 71,25±0,61% au jour 3 à 69,11±0,772% au jour 9. Le galactose et le N-acétylglucosamine augmente légèrement en fonction du temps de culture chez les deux souches ; excepté le N-acétylglucosamine qui diminue chez *Phytophthora megakarya*. Le galactose passe de 12,83±0,58% au jour 3 à 12,91±1,23% au jour 9 chez *Phytophthora megakarya* et de 11,70±0,41% au jour 3 à 11,70±0,76% au jour 9 chez *Pythium myriotylum*. Quant au N-acétylglucosamine sa teneur varie de 8,49±0,30% au jour 3 à 7,05±0,62% au jour 9 chez *Phytophthora megakarya*, tandis que chez *Pythium myriotylum*, sa teneur varie de 9,85±0,83% au jour 3 à 10,90±0,83% au jour 9. Parmi les sucres minoritaires (rhamnose, xylose, mannose, acides galacturonic et glucuronic), le mannose est le plus représentatif, suivis de l'acide glucuronic et galacturonic ; dont les teneurs augmentent légèrement avec le temps de culture (Figure 21).

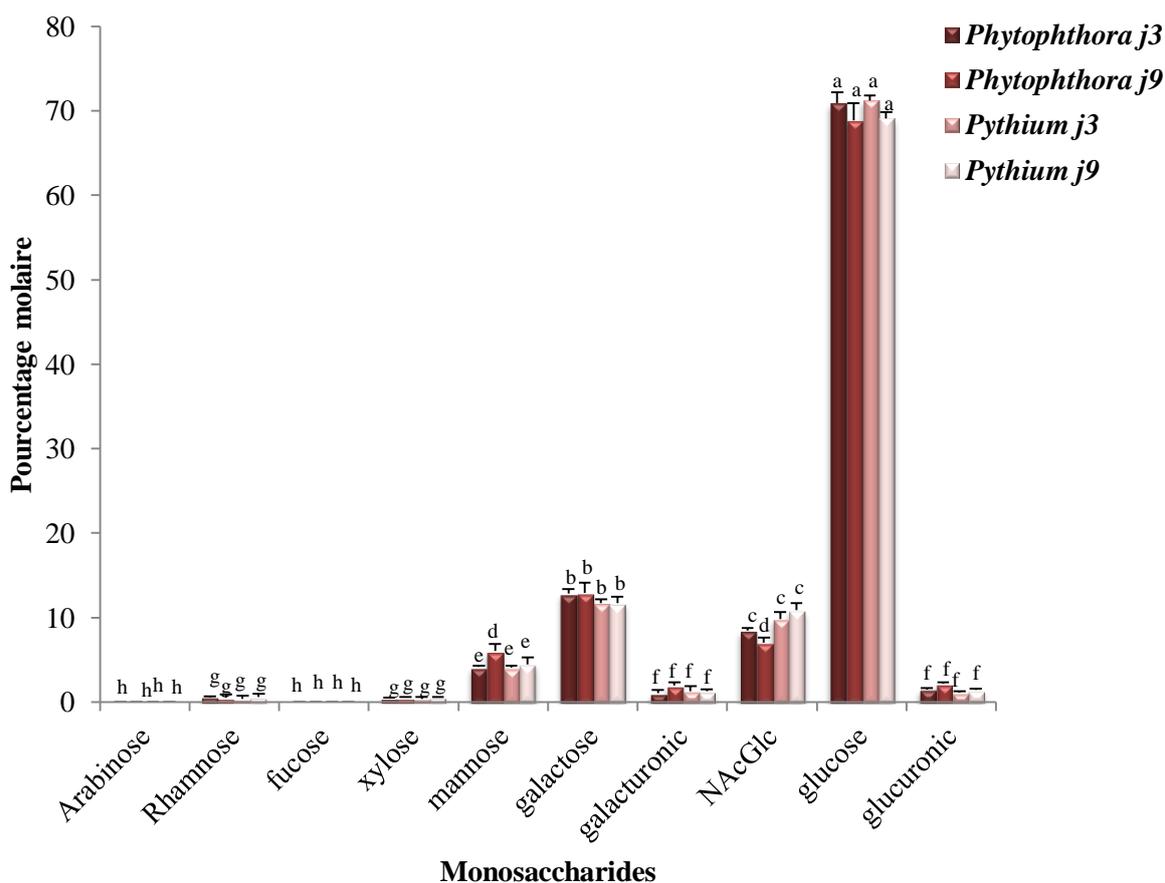


Figure 21 Composition en monosaccharides des fractions insolubles en milieu alcalin (ALI) chez les deux souches. *a> b> c> d> e> f> g> h pour les pourcentages molaires en monosaccharides des différentes fractions pariétales.

III-2 DICUSSION

Chez les microorganismes eucaryotes, la capacité à croître de façon filamenteuse est partagée par les champignons du phylum fungi et les oomycètes (Badreddine, 2008). L'une des particularités des cellules de champignons est d'être entourée par une paroi. La paroi constitue la matrice extracellulaire qui entoure la cellule et sépare le contenu cytoplasmique du milieu environnementale. Principalement constituée de polysaccharides [β -(1,4)-glycanes (cellulose et chitine), β -(1,3)-glucanes, β -(1,6)-glucanes] et de protéines elle intervient dans la viabilité et la pathogénicité fongique (De Groot *et al.* 2005). Notre travail avait pour objectif général d'analyser les polysaccharides de la paroi cellulaire de deux oomycètes (*Phytophthora megakarya* et *Pythium myriotylum* phytopathogènes respectivement de *Theobroma cacao* et de *Xanthosoma sagittifolium l. schott*) à différents jours de leur croissance mycélienne. A cet effet, une suspension sporale calibrée à 1000 spores/ μ l de *Phytophthora megakarya* et *Pythium myriotylum* a été mis en croissance (dans une enceinte obscure) en agitation dans un même milieu de culture et les biomasses myceliales ont été collectées à trois jours et neuf jours de croissance pour l'extraction et fractionnement de la paroi. Ensuite l'analyse du profil monosaccharidique des différentes fractions pariétales a été faite.

La culture fongique en milieu liquide (Extrait de malt) à l'obscurité d'une suspension sporale calibrée (1000spores/ μ l) semble adéquate à la croissance de *Phytophthora megakarya* et *Pythium myriotylum*. Cependant, la croissance mycélaire dans ce milieu est plus favorable chez *Pythium myriotylum* que chez *Phytophthora megakarya*. Ce résultat est en accord avec les travaux de Nzietchueng (1988) qui montrent que le milieu MBM (Malt Broth Mehrlich), suivie d'ERM (Le milieu a base d'extraits de racines de macabo) est favorable à la croissance mycélienne de *Pythium myriotylum*. Aussi, les milieux contenant le saccharose, le glucose et l'amidon comme source de carbone soutiennent une bonne croissance de *Pythium myriotylum*. L'extraction et le fractionnement de la paroi de *Phytophthora megakarya* et *Pythium myriotylum* montre que la paroi (fraction insoluble dans l'alcool (AIS)) de ces deux oomycètes comme celle des autres champignons (l'ascomycète *Botrytis cinerea* (Cantu *et al.* 2009), *Saccharomyces cerevisiae* et *A. fumigatus* (Latgé 2009) et oomycètes (*Aphanomyces euteiches* (Badreddine 2008)), est constituée de deux fractions en fonction de sa solubilité en milieu alcalin: ALS (fraction soluble en milieu alcalin) et ALI (fraction insoluble en milieu alcalin). La quantité de paroi totale (AIS) ne varie pas entre ces deux oomycètes. Elle diminue légèrement avec l'augmentation du nombre de jours de culture chez les deux souches. Cette variation pourrait s'expliquer par l'épuisement des nutriments (source de carbone) dans le

milieu de culture, amenant le microorganisme à dégrader ses propres substances pour survivre et entraînant par conséquent une diminution de la quantité de la paroi. Ceci signifierait que la croissance maximale de *Phytophthora megakarya* et *Pythium myriotylum* se situerait en dessous de 9 jours. Le fractionnement de la paroi totale (AIS) montre que les fractions ALS (fraction soluble en milieu alcalin) et ALI (fraction insoluble en milieu alcalin) sont plus abondantes chez *Phytophthora megakarya* que chez *Pythium myriotylum*. La fraction ALS ne varie pas avec l'augmentation du nombre de jours de culture chez *Phytophthora megakarya*, tandis qu'elle augmente légèrement chez *Pythium myriotylum*. Quant à la fraction ALI, elle diminue avec l'augmentation du nombre de jours de culture chez *Phytophthora megakarya* tandis qu'elle augmente chez *Pythium myriotylum*. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse de la fraction pariétale (AIS) chez ces deux oomycètes montre une prédominance en glucose. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par Cantu *et al.* (2009) et Latgé (2009) qui ont montrés que le glucose est le sucre prédominant de la paroi respectivement de l'ascomycète *Botrytis cinerea* et de deux champignons (*Saccharomyces cerevisiae* et *A. fumigatus*). Nakajima *et al.* (1977) ont montré que le glucose principal constituant de la paroi des champignons peut être présent sous forme de glucanes ou sous forme de composants mineurs des autres polysaccharides tels les glycoprotéines. Comme chez *Botrytis cinerea* (Cantu *et al.* 2009) et les champignons (*Saccharomyces cerevisiae* et *A. fumigatus*) (Latgé 2009), le galactose et le mannose sont les autres sucres représentatifs de la paroi de *Phytophthora megakarya* et *Pythium myriotylum*. La forte teneur en glucose au niveau de la paroi de ces deux oomycètes traduira la nature cellulosique des polysaccharides majoritaire de leur paroi. L'augmentation de cette teneur du 3^{ème} jusqu'au à 9^{ème} jour de culture pourrait s'expliquer par le changement de l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse et le remaniement de la paroi au cours de la croissance mycélienne (Bowman & Free 2006, Lesage & Bussey 2006). Les faibles proportions des N-acétylglucosamine ($4,82 \pm 0,38$ au jour 3 et $4,14 \pm 0,31$ au jour 9 chez *Phytophthora megakarya* et $5,31 \pm 0,61$ au jour 3 et $5,37 \pm 0,27$ au jour 9 chez *Pythium myriotylum*) chez ces deux oomycètes traduiraient la présence de faible proportions de chitine au sein de leur paroi. Ceci est en relation avec les travaux de Badreddine (2008) qui ont montré qu'alors que les oomycètes sont considérés comme des organismes cellulosiques contenant très rarement de la chitine, l'analyse biochimique des parois cellulaires d'*Aphanomyces euteiches* (oomycète) a montré la présence de 10% de N-acétylglucosamine (GlcNAc), correspondant à des chitosaccharides non cristallins associés à d'autres glucanes pariétaux, plutôt qu'à de la chitine cristalline.

L'analyse des différentes fractions pariétales (ALS et ALI) de *Phytophthora megakarya* et *Pythium myriotylum* montre qu'elles sont majoritairement constituées de glucose comme la paroi. Ce glucose est beaucoup plus abondant dans la fraction ALI (70,93±1,30 au jour 3 à 68,87±2,05 au jour 9 chez *Phytophthora megakarya* et 71,25±0,61 au jour 3 à 69,11±0,72 au jour 9 chez *Pythium myriotylum*) que dans la fraction ALS (57,02±1,19 au jour 3 à 56,06±0,48 au jour 9 chez *Phytophthora megakarya* et 49,51±1,45 au jour 3 à 52,58±3,73 au jour 9 chez *Pythium myriotylum*). Ceci s'expliquerait par le fait qu'en plus d'être glycosylé aux autres sucres mineurs (galactose, mannose, arabinose et xylose), le glucose s'associerait aussi aux molécules de chitine; ce qui montre une abondance en N-acétylglucosamine dans la fraction ALI (8,49±0,30 au jour 3 à 7,05±0,62 au jour 9 chez *Phytophthora megakarya* et 9,85±0,83 au jour 3 à 10,90±0,83 au jour 9 chez *Pythium myriotylum*) contrairement à la fraction ALS (1,16±2,32 au jour 3 à 5,23±0,14 au jour 9 chez *Phytophthora megakarya* et 4,25±2,84 au jour 3 à 1,28±2,57 au jour 9 chez *Pythium myriotylum*). Ces travaux sont en accord avec ceux de Hartland *et al.* (1994) qui ont montré que la fraction ALI constitue le squelette structural de la paroi et comprend les β -glucanes covalamment liés à la chitine. La fraction ALS quant à elle était constituée des protéines, des polysaccharides à l'instar de α -1,3 / 1,4 glucanes, mannanes et galactofurans chez *A. fumigatus* et de β -1,3 / 1,6-glucanes et mannanes chez *S. cerevisiae* (Latge, 2009). Lesage & Bussey (2006) ont montré que dans les parois cellulaires des levures, les mannanes sont largement associées aux protéines dans lesquelles le galactose et mannoses constituent la parties saccharidique des glycoprotéines. *Pythium myriotylum* a plus de glucose dans sa fraction ALI que *Phytophthora megakarya* qui quant à elle a plus de glucose dans sa fraction ALS. Galactose et mannose sont moins représentés que xylose, arabinose, acides galacturonique et glucuronique qui représentent les monosaccharides minoritaires de ces fractions.

CHAPITRE IV:IMPLICATION SUR LE SYSTEME EDUCATIF DU SUJET

La didactique des SVT regroupe l'ensemble des techniques qui se penchent sur les questions suivantes : Comment doit-on enseigner ? Faire apprendre efficacement les sciences de la vie et de la terre? Elle constitue un champ de recherche visant à apprécier les objectifs de l'enseignement scientifique à renouveler les méthodologies et à en améliorer les conditions d'apprentissage pour les élèves (Atanga, 2010). La méthodologie utilisée et la mieux adaptée dans le processus enseignement apprentissage est dite Di.P.H.Te.R.I.C., ici l'enseignant de SVT doit tenir compte de : Données Initiales – Problème scientifique – Hypothèses – Test des Hypothèses – Résultats – Interprétations – Conclusions. L'objectif poursuivi ici est de remplacer le magistrocentrisme où l'enseignant est au centre du processus enseignement apprentissage par le constructivisme où l'élève est au centre et construit lui-même son savoir. Ceci se fera sous la base de la compétence de l'enseignant qui selon Atanga (2015) est une macro-objectif ou en fait un ensemble d'objectifs intégrés. Ainsi selon le référentiel de compétences SVT pour le collège, il existe quatre types de compétences en SVT (S'informer-Raisonner-Réaliser-communiquer). Ces compétences permettront à l'enseignant d'extraire ou de saisir les informations, de les mettre en relation en utilisant une démarche expérimentale, ensuite de concevoir un objet soit par manipulation, soit par expérimentation et enfin de s'exprimer (écrit, orale, représentation ou d'une forme de langage à une autre). Nous essayerons d'appliquer à la didactique des SVT les travaux réalisés dans les précédents chapitres, de ressortir leurs incidences sur les compétences, les connaissances les savoir être à acquérir par les apprenants. Il s'agira aussi de ressortir par une leçon, les implications didactiques des travaux réalisés sur les SVT en classe de 5^{ème}.

Ces travaux contribueront à l'amélioration de la compréhension des objectifs dans les classes du secondaire particulièrement les classes de 5^{ème} et 2^{nde}.

- L'amélioration de la qualité et de la quantité de production : lutte contre les parasites des végétaux en 5^{ème} ;
- L'influence des différentes caractéristiques du sol sur la production végétale : les microorganismes en 2^{nde}.

Sera jointe à ceci, une fiche pédagogique de présentation d'une leçon de SVT dans une classe de 5^{ème}.

**FICHE PEDAGOGIQUE DE PREPARATION D'UNE SEANCE D'ENSEIGNEMENT / APPRENTISSAGE
SELON L'APPROCHE PAR COMPETENCE (APC).**

ETABLISSEMENT:	LYCEE GENERAL LECLERC	MANEJIO MBOUDA CHIMENE LADOUCE	
MODULE: I	Le monde Vivant	Matricule: 04S075 Contact: 679621992	
FAMILLE DE SITUATIONS:	Couverture des besoins de l'Homme en ressources animale et végétale	Date:	
EXEMPLE DE SITUATIONS:	Insuffisance des ressources comestibles	Classe:	5^{ème}
PALIER DE COMPETENCES:	Communiquer avec son entourage au sujet de l'insuffisance des ressources comestibles	Effectif:	G: F:
CATEGORIE D' ACTIONS	Amélioration de la production animale et végétale	Durée:	06 heures
SEQUENCE D'E/A N°2	Influence du milieu sur la pratique de l'agriculture et l'élevage	Durée:	03 heures
TITRE DE LA SEANCE D'E/A	Amélioration de la qualité et de la quantité des productions: lutte contre les parasites des végétaux	Durée:	55 min
		Période:	09h30-10h25
Objectif Pédagogique Opérationnel :	A la fin de cette séance d'E/A, l'apprenant sera capable d'expliquer les différentes méthodes de lutte contre les parasites des plantes.		

Etapes	Actions spécifiques à mener	Contenus spécifiques aux OPOI	Matériels	Activités enseignement/apprentissage	Evaluation de l'atteinte des OPOI	Durée
INTRODUCTION	<p>1. Etablir le contrat Enseignant / Apprenants</p>	<p>Titre Amélioration de la qualité et de la quantité des productions : lutte contre les parasites des végétaux</p> <p>Objectifs</p> <ul style="list-style-type: none"> -Définir parasites des végétaux, maladie de plante -Identifier les différents parasites des végétaux -Expliquer les causes et manifestation des maladies des plantes -Décrire les différentes méthodes de lutte contre les maladies des plantes 	<p>Programme officiel, Vécu quotidien, Situation de vie contextualisée</p>	<p>Ecrire le titre de la leçon au tableau</p> <p>Communique les objectifs de la leçon</p> <p>Prise des notes par les élèves</p>		<p>15mn</p>

<p>2. Vérifier les pré-requis</p>	<p>Les êtres, pour rester toujours en vie doivent se nourrir. Ceci nécessite un apport continu en qualité et en quantité de ressources comestibles. c'est la raison pour laquelle les agriculteurs doivent maintenir au quotidien le taux de production à la normale. Cependant ils sont confrontés à certain problèmes tel la qualité des semences, facteurs environnementaux (climat, sol parasites etc...) qui nuisent la qualité et quantité de production. Les parasites des végétaux (champignons, bactéries virus, insectes etc..) sont des êtres vivants étrangers à un organisme végétal, qui peuvent être nuisibles ou non.</p>	<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Programme officiel, Vécu quotidien, Situation de vie contextualisée</p>	<p>Pose les questions Valide les réponses</p> <p>Procède à la remédiation</p>	<p>Q1 : Que doivent faire les êtres, s'ils tiennent à rester toujours en vie ?</p> <p>Q2 : De quoi se nourrissent-ils ?</p> <p>Q3 : Est-ce que tout chacun mange à sa faim tous les jours ? Pourquoi ?</p> <p>Q4 : Quels sont les principaux problèmes rencontrés par les agriculteurs ?</p> <p>Q5 : définir parasites des végétaux et citer en certains que vous connaissez?</p>
<p>3. Déterminer l'intérêt de la séance d'apprentissage</p>	<p>La connaissance des différents parasites des plantes permet de sensibiliser les populations sur les dégâts qu'ils causent et ensuite de connaître leur méthode d'invasion et enfin de mettre en œuvre les stratégies de lutte contre ces parasites</p>		<p>Pose les questions</p> <p>Valide les réponses</p> <p>Procède à la remédiation</p>	<p>Q6: Que peut-on faire pour lutter contre les parasites des plantes ?</p>

<p>4. Identifier et formuler le problème à résoudre</p>	<p><u>Situation de vie contextualisée</u></p> <p>Les grands-parents de Fofana élève au Lycée Général Leclerc résident dans la région du Centre- Cameroun et possèdent deux grandes plantations. Dans l'une ils pratiquent la culture du cacao et dans l'autre; la culture du macabo, d'arachides et bien d'autres cultures vivrières. Cette année, la production dans les plantations des grands parents de Fofana n'était pas bonne à causes de l'invasion des plantes par les insectes, les champignons, les oomycètes, les chenilles, les virus etc...Ces derniers ont attaqué les feuilles, les tubercules, les cabosses le tronc etc... entraînant ainsi les maladies des plantes et altérant par conséquent la qualité et la quantité de production. Ce qui fait qu'au lieu des dizaines de sacs qu'ils ont l'habitude de récolter, ils en ont eu trois sacs de moins bonne qualité.</p>	<p>Programme officiel, Vécu quotidien, Situation de vie contextualisée</p>	<p>R7. La baisse de la qualité et la quantité de production</p> <p>R8. A l'invasion des plantations par les insectes, champignons, chenilles etc....</p> <p>R9. Parasites des plantes. parce qu'ils sont à l'origine des maladies des plantes</p> <p>R10. ces parasites altèrent la qualité et la quantité de production</p> <p>R11. Identifier les différents parasites, étudier leur processus d'invasion, mettre en œuvre les méthodes de lutte (chimique et biologique) et enfin entretenir les plantations et les plantes.</p>	<p>Q7. Quel est le problème suggéré dans le texte?</p> <p>Q8. A quoi est due cette diminution du taux de production?</p> <p>Q9. Quel dénomination donne-t-on à l'ensemble les insectes, champignons, oomycètes, chenilles, virus etc... ? Pourquoi?</p> <p>Q10. Quel est l'impact de ces parasites sur la qualité et la quantité de production ?</p> <p>Q11. Quels conseils Fofana doit-il prodiguer à ses grands-parents afin d'améliorer la qualité et la quantité de leur production l'année suivante?</p>
--	---	---	--	--

DEVELOPPEMENT	-Définir Parasite des végétaux, maladie de plante	<p>I. Amélioration de la qualité et de la quantité des productions</p> <p>I.1. lutte contre les parasites des végétaux</p> <p style="padding-left: 40px;">a- Définitions</p> <p>Parasite des végétaux: est un être vivant étranger à un organisme végétal, qui peut être nuisible ou non.</p> <p>Maladie de plante: est une succession de réponses invisibles et visibles des cellules et tissus d'une plante suite à l'attaque par un micro-organisme ou à la modification d'un facteur environnemental qui entraîne un bouleversement de forme, de fonction ou d'intégrité de la plante.</p>	Programme officiel, Livre au programme, Vécu quotidien, Situation de vie contextualisée	<p><u>Activité 1</u></p> <p>Exploitation du support pédagogique (Planches 1 et 2)</p>	<p>D'après les documents de la planche 1 et 2 ;</p> <p>Q12. Définir parasite des végétaux?</p> <p>Q13. Définir maladie de plante ?</p>	30 min

<p>-Identifier les différents parasites des végétaux</p> <p>-Expliquer les causes et manifestation des maladies des plantes</p> <p>-Décrire les différentes méthodes de lutte contre les maladies des plantes</p>	<p>b- Les maladies des plantes: causes manifestation et moyen de lutte</p> <p>Tableau à remplir</p> <p>Notion construite: l'identification des différents parasites des plantes permet de lutter contre ces dernier par utilisation des fongicides, des pesticides et insecticides.</p> <p>c- Entretien des Plantes : cas d'une cacaoyère</p> <p>L'entretien passe par:</p> <ul style="list-style-type: none"> - le désherbage manuel ou chimique, -la taille, -le réglage de l'ombrage, -la fertilisation et la lutte phytosanitaire. <p>Notion construite: l'entretien des plante passe par un bon assainissement, une bonne aération des plantations et l'utilisation des fertilisants.</p>	<p>Programme officiel, Livre au programme, Vécu quotidien, Situation de vie contextualisée</p>	<p>Activité 2</p> <p>Exploitation du support pédagogique (planches 1 et 2 ; livre au programme page 27-30)</p> <p>Activité 3</p> <p>Exploitation du support pédagogique (planches 3)</p>	<p>Q14. A partir des documents des planches ; identifier les différents plantes parasités ainsi que leur parasites respectives ?</p> <p>Q15. Quels sont leurs manifestations et symptômes sur ces plantes ?</p> <p>Q16. Proposer les mesures préventives ainsi que les moyens de lutte contre ces parasites?</p> <p>Q17. D'après les documents de la planche 3, quels sont les étapes d'entretien d'une cacaoyère ?</p>
--	--	--	--	---

CONCLUSION	<p>Synthèse des notions. construites Les champignons, les oomycètes, les insectes, le gui d’Afrique etc. sont les parasites responsables de la mauvaise qualité et quantité de production végétale. La lutte contre ces parasites et maladies des plantes passe d’abord par l’entretien et l’aération des plantations; et aussi par l’utilisation des fertilisants, herbicides, fongicides, insecticides, pesticides etc.</p> <p>NB. Phytopathologie: est l’étude des micro-organismes et des facteurs environnementaux qui induisent des maladies chez les plantes, des mécanismes par les quels ces différents éléments agissent et des méthodes de préventions et de contrôles des maladies</p> <p>Devoir : Proposer les actions à mener permettant de lutter contre les parasites des plantes et d’accroître la production végétale.</p> <p>Jeu bilingue : translate the following words in English (champignons, insectes, maladies des plantes, cacao, macabo)</p> <p>R: fungi, insects, plants health, cocoa, cocoyam</p>	<p>Pose les questions</p> <p>Valide les réponses</p> <p>Procède à la remédiation</p>	<p>Q18. Citer les différents parasites des plantes ?</p> <p>Q19. Quels sont les symptômes des maladies des plantes ?</p> <p>Q20. Expliquer les moyens de lutte ainsi que la mesure préventive contre ces maladies.</p>	08 min
-------------------	---	--	---	---------------

Références documentaires :

- Programme officiel de Sciences ; 6^{ième} – 5^{ième} ; page 9/23 ;
- Les Majors en Sciences et Technologie 5^{ième} ; page 27-30.
- Atanga, 2010. Didactiques générales des Sciences de la Vie et de la Terre. Cours SED 519 Bio- ENS.
- Atanga, 2015. Didactiques générales des Sciences de la Vie et de la Terre. Cours SED 519 Bio- ENS.
- BAD Education IV. Module de formation des vacataires en SVT. Référentiel de compétences SVT pour le collège. Fiche contenu 5b. pp 79-80.

➤ Internet.

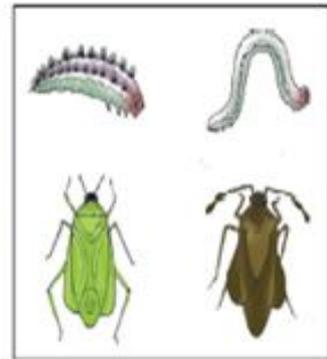
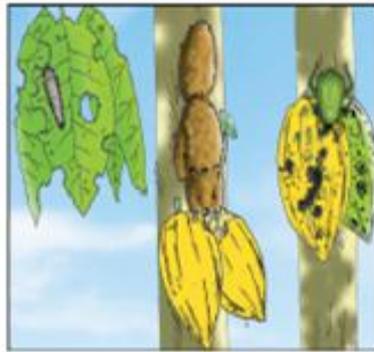
b- Les maladies des plantes: causes manifestation et moyen de lutte

Plantes parasitées ou atteintes de maladies	Parasites et ennemis des plantes	Manifestations / symptômes	Moyens de lutte
Cacaoyer (<i>Theobroma cacao</i>), Macabo (<i>Xanthosoma sagittifolium</i>), tomates, haricots, arachides	Champignons microscopiques, moisissures, oomycètes (EX: <i>Phytophthora megakarya</i> , <i>Pythium myriotylum</i>)	Pourriture brune des cabosses, pourriture des racines, tiges tubercules ; jaunissement et dessèchement des feuilles	Utilisation des fongicides avant les semis ; choix des semences saines ; drainer et fertiliser le sol
Cacaoyer (<i>Theobroma cacao</i>), tomates, haricots, arachides, concombre, manioc	Insectes (cochenille, chenille, termites mouches)	Perforation des feuilles, tiges, tubercules, fruits ; perte des feuilles et mort de la plante	Utilisation des insecticides sur les lignes de semis ; destruction des insectes au premier stade de développement
Cacaoyer (<i>Theobroma cacao</i>), maïs, concombre, mil	Virus (Virus de l'œdème des pousses de cacao, virus de la mosaïque etc.)	Gonflement des tiges, bandes rougeâtres sur les jeunes feuilles, feuilles jaunes, mosaïque sur les feuilles, plantes chétives	Arracher les plantes malades et les brûler, maîtriser le calendrier agricole, préparation du sol.
Maïs, haricots, patates	Charançons	Trous sur les tiges les tubercules les graines	Rotation des cultures, brûler les débris de végétaux après récolte, maîtrise de l'influence des facteurs climatiques.
Maïs, mil, arachides, manioc	Oiseaux, animaux rongeurs (rats, hérissons ; taupes)	Consommation des semences, graines et tubercules ; baisse de la productivité	Confection de fausses sentinelle, tendre les pièges
Avocatier, manguier,	Gui d'Afrique	Envahi le tronc de l'arbre, baisse de la productivité	Entretien des plantes et des plantations

Planche 1. Les maladies et parasites des plantes



P. megakarya sur une cabosse de cacao, Cameroun. Photo H. Evans © CABI Bioscience



Pourriture brune

Pourriture noire



Craquement du tronc de cacaoyer provoqué par le pourridié



Assèchement du cacaoyer provoqué par le pourridié

Pourridié



Gonflement des pousses



Rougisement des nervures

Virus de l'œdème des pousses de cacao

↑ Parasites du cacao



Thrips



Mirides



Dégâts de mirides sur cabosse



Psylles



Anomis Leona
Chenilles defoliatrices

↑ Les insectes nuisibles du cacaoyer



Planche 2 Les maladies et parasites des plantes

La cercosporiose

Agent causal: *Cercospora arachidicola*



Figure 2

La chenille est de couleur très variable: grise, noire, brune, rougeâtre; avec 2 taches triangulaires noires situées au dernier segment abdominal. Elle mesure 3 mm après éclosion et environ 30 mm au dernier stade (Figure 9).



Figure 9

Spodoptera littoralis

Le papillon a une envergure de 35 à 45 mm, les ailes antérieures sont ornées de lignes et de dessins blanc jaunâtre enchevêtrés. Les ailes postérieures sont blanches (Figure 8). L'oeuf mesure environ 0,5 mm de diamètre.



Figure 8

La pourriture sèche des racines et des gousses

Agent causal: *Rhizoctonia solani*



Figure 5

Pourriture blanche

Agent causal: *Sclerotium rolfsii*



Figure 6

Importance

Le développement de cette maladie sur arachide reste localisé et peu important dans le périmètre du Loulkro.



Maladies et parasites de la tomate



Pomme de terre infectée par le mildiou (*Phytophthora infestans*)

7. Il est important de calibrer le débit de votre pulvérisateur

Employez la bonne quantité d'eau (volume débit) et de mélange de pesticide.

Posez-vous les questions suivantes:

- Quel est le volume de votre pulvérisateur?
- Combien d'arbres allez vous traiter avec un pulvérisateur de produit?
- Combien de pleins de pulvérisateurs ont été réalisés pour traiter un champs?



- Ne mélangez que la quantité de pesticide nécessaire pour votre traitement

4. Protection Personnelle Minimale

- ✓ Portez un chapeau contre les chutes de gouttelettes
- ✓ Portez un habillement confortable qui protège autant que possible le corps et les membres.
- ✗ mais ne mettez pas des combinaisons précédemment souillées
- ✓ Un masque est particulièrement important pour les pesticides irritants ou nocifs: il peut être fabriqué à partir d'une bouteille de boissons en plastique de 2L, et maintenue avec des cordes.



- ✓ Portez votre pantalon à l'extérieur des bottes
- ✓ Si vous employez un atomiseur, les protège-oreilles sont indispensables.



Planche 3. Entretien du cacaoyer



Désherbage manuel



Désherbage chimique



Plantation adulte bien constituée

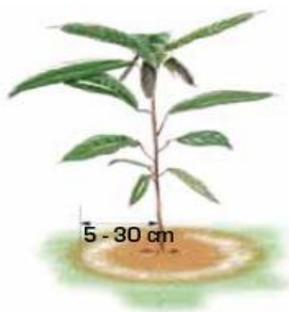
↑ *Plantation adulte bien constituée*



Avant la taille

Sélection des branches à tailler et taille jusqu'à 4 m de haut

Architecture de « verre à vin » pour un meilleur éclairage



Début de plantation



Super triple phosphate
100 g par pied 2 fois par an

Plantation de 2 à 3 ans



0-23-19+10 Cao+5 Mgo-150 à 200 g
par pied par an

Plantation de 4 ans et +

↑ *Épandage évolutif d'engrais sur cacaoyer*

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Malgré son rôle essentiel dans la protection de la cellule, la paroi cellulaire des champignons est restée moins étudiée et sa biosynthèse incomplètement comprise. Notre étude avait pour objectif principal d'enrichir les connaissances actuelles sur la composition de la paroi cellulaire des oomycètes, particulièrement le comportement des polysaccharides de la paroi cellulaire des oomycètes phytopathogènes au cours de la croissance mycélienne. A cet effet, après extraction et analyse de la paroi (AIS) et de ses différentes fractions (ALS et ALI), il ressort que :

- ❖ la quantité de paroi (AIS) ne diffère pas entre *Phytophthora megakarya* et *Pythium myriotylum*. les fractions ALS et ALI sont plus abondantes chez *Phytophthora megakarya* que chez *Pythium myriotylum*. les quantités de ces fractions augmentent avec le temps de culture chez *Pythium myriotylum*.
- ❖ le glucose est le monosaccharide majoritaire de la paroi de *Phytophthora megakarya* et *Pythium myriotylum*. On note la présence d'une faible proportion de N-acétylglucosamine; cette dernière est plus abondante dans la fraction ALI que dans la fraction ALS.

PERSPECTIVES

La molécule de N-acétylglucosamine étant l'unité structurale des molécules de chitine dont l'absence a été observé chez les plantes et animaux; sa présence dans la paroi cellulaire de *Phytophthora megakarya* et *Pythium myriotylum* particulièrement dans la fraction ALI permettra de mieux comprendre son implication aussi bien dans le processus de remodelage de la paroi que dans la pathogénicité. Ainsi, dans nos études ultérieures nous proposons afin de mettre en place de nouvelles stratégies de défense contre ces oomycètes phytopathogènes:

- ❖ d'étudier et d'analyser les enzymes impliquées dans la biosynthèse de ces biomolécules (N-acétylglucosamine) au niveau de la paroi ;
- ❖ de suivre l'évolution de ces enzymes au cours de la croissance mycélienne;
- ❖ d'analyser sa structure tridimensionnelle et son implication dans l'architecture pariétale.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams DJ, (2004).** Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* **150**: 2029–2035.
- Aguilar-Uscanga, B. and Francois, J. M. (2003).** A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**, 268-27
- Akrofi. A.y. (2015).** *Phytophthora megakarya*: a review on its status as a pathogen on Cacao in west Africa. *African Crop Science Journal*, Vol. **23**, No. 1, pp. 67 – 87.
- Andersson, M. G. and Cerenius, L. (2002).** Analysis of chitinase expression in the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*. *Dis Aquat Organ.* **29**: 139-47.
- Attard, A., gourgues, M., galiana, E., panabieres, f., ponchet, M. & keller, H. (2008).** Strategies of attack and defense in plant-oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. Nicotianae* Breda de Haan). *J Plant Physiol*, **165**: 83-94.
- Badreddine Ilham, (2008).** Etude des surfaces cellulaires d'*Aphanomyces euteiches*, parasite majeur de légumineuses. Thèse en vue de l'obtention du doctorat de l'université de Toulouse. Spécialité : Biosciences végétales. Unité de recherche: *UMR5546 CNRS UPS Surfaces Cellulaires et Signalisation chez les Végétaux, Pôle de Biotechnologie Végétale, 24, chemin de Borde-Rouge, BP42617Auzeville,31326 Castanet-Tolosan.*
- Bagyaraj. D.J. and Arpana. J. (2006).** Diversity of Microbes and Cryptograms. *Fungi – 1.* #41, RBI colony, Anand Nagar, Bangalore-560 024.
- Bartnicki-Garcia S, 1968.** Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annual Review of Microbiology* **22**: 87–108.
- Barr, D.J.S., 1983,** The zoosporic grouping of plant pathogens, entity or no-entity. *Zoosporic Plant Pathogens, A Modern Perspective* (S. T. Buczaki), edition Academic Press.
- Bektic, J., Lell, C.P., Fuchs, A., Stoiber, H., Speth, C., Lass-florl, C., Borg-von zeppelin, M., Dietrich, M.P. and Wurzner, R. (2001).** HIV protease inhibitors attenuate adherence of *Candida albicans* to epithelial cells in vitro. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **31**, 65-71.
- Birch, P.R.J., Rehmany, A.P., Pritchard, L., Kamoun, S. and Beynon, J.L. (2006).** Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Trends Microbiol.* **14**: 8-11.
- Boller, T. (1995).** Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 189–214.
- Boudjeko Thadde´e, Andème-Onzighi Christine, Vicré Maïte, Balange Alain-Pierre, Omokolo Ndoumou Denis et Driouich Azeddine. (2006).** Loss of pectin is an early event during infection of cocoyam roots by *Pythium myriotylum*. *Planta.* **223**: 271–282.

- Bowman S, and Free S, (2006).** The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* **28**: 799–808.
- Brasier C.M., and Griffin M. (1979).** Taxonomy of *Phytophthora Palmivora* on cocoa. *Transaction of the British Mycological society* **72**: 111-143.
- Bulone, V., Chanzy, H., Gay, L., Girard, V. and Fèvre, M. (1992).** Characterization of chitin and chitin synthase from the cellulosic cell wall fungus *Saprolegnia monoica*. *Exp. Mycol.* **16**: 8-21.
- Cabib, E., Roh D.H., Schmidt, M., Crotti, L.B. and Varma, A. (2001).** The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Biol Chem.* **23**: 19679-82.
- Cantu D, Vicente AR, Greve LC, Dewey FM, Bennett AB, Labavitch JM, Powell ALT, (2008a).** The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 859–864.
- Cantu D, L. Carl greve, John M. Labavitch, Ann L. T. Powell, (2009).** Characterization of the cell wall of the ubiquitous plant Pathogen *Botrytis cinerea*. *The British Mycological Society.* **113**: 1396 – 1403
- Chiou CC, Mavrogiorgos N, Tillem E, Hector R, Walsh TJ, (2001).** Synergy, pharmacodynamics, and time-sequenced ultrastructural changes of the interaction between nikkomycin Z and the echinocandin FK463 against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 3310–3321.
- Cid, V.J., Duran, A., Rey, D.D., Snyder, M.P., Nobela, C. and Sanchez, M. (1995).** Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **59**, 345–386.
- Cordier T. (2007).** Recherche d'oomycètes dans des peuplements forestiers déperissants en Pologne. Geneva, Switzerland, 68pp. Manuscrits.
- Dakwa, J.T. 1987.** A serious outbreak of blackpod disease in a marginal area of Ghana. *Proceedings of the 10th Int.Cocoa Res. Conf.*, Santo Domingo, Dominican Republic, 17- 23rd May, 1987.
- De Groot PWJ, Ram AF, Klis FM, (2005).** Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genetics and Biology* **42**: 657–675.
- Despre´aux, D., Cambony, D., Cle´ment, D., Nyasse´, S. and Partiot, M. 1988.** Etude de la pourriture brune des cabosses du cacaoyer au Cameroun: de´finition de nouvelles me´thodes de lutte. In: *Cocoa Producers'Alliance (Eds.). Proceedings of the 10th International Cocoa Research Conference, Cocoa Producers Alliance, 1987.* Santo Domingo, Dominican Republic. pp. 407- 412.
- Dick, M.W., 1982,** Oomycetes. *Synopsis and Classification of Living Organisms, vol.1*, edition McGraw-Hill Book Co., New York, p.179-180
- Dick, M.W. (1999).** Classification of the Peronosporomycetes. *Encyclopaedia of food microbiology.* P. Patel. London, Academic Press: 871-882.

- Ehrlich, H., Krautter, M., Hanke, T., Simon, P., Knieb, C., Heinemann, S. and Worch, H. (2007).** First evidence of the presence of chitin in skeletons of marine sponges. Part II. Glass sponges (Hexactinellida: Porifera). *J. Exp. Zoolog. B Mol. Dev. Evol.* **308**: 473-483.
- Erwin, D. C. and Ribeiro, O. K. (1996).** *Phytophthora diseases worldwide*, Minnesota, USA, *The American Phytopathology Society*.
- Farr, D.F., Rossman, A.Y., Palm, M.E., and McCray, E.B. (n.d.) (2007)** Fungal Databases, Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved April 25, 2007,
- Feyisara Olorunleke, Amayana Adiobob, Joseph T. Onyekac, Monica Höftea. (2014).** Cocoyam Root Rot Disease caused by *Pythium myriotylum* in Nigeria. *Conference on International Research on Food Security, Natural Resource Management and Rural Development organised by the Czech University of Life Sciences Prague*
- Förster H; Coffey M.D; Elwood H., and Sogin M.L. (1990).** Sequence analysis of the small subunit RNAs of three zoospore fungi and implication of fungal evolution. *Mycologia* **82**: 306-312.
- Gastebois A, Clavaud C, Aïmanianda V, Latgé J- P, (2009).** *Aspergillus fumigatus*: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization. *Future Microbiology* **4**: 583–595.
- Geschiere, P. and Konings, P. (1912).** *Itinéraires d'accumulation au Cameroun*.
- Hartland R, Vermeulen C, Klis F, Sietsma J, Wessels J, (1994).** The linkage of (1-3)- β -glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1591–1599.
- Harutyunyan, S. R., Zhao, Z., Den Hartog, T., Bouwmeester, K., Minnaard, A. J., Feringa, B. L. & Govers, F. (2008).** Biologically active *Phytophthora* mating hormone prepared by catalytic asymmetric total synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**: 8507-8512.
- Helbert, W., Sugiyama, J., Ishihara, M. and Yamanaka, S. (1997).** Characterization of native crystalline cellulose in the cell walls of Oomycota. *Journal of Biotechnology*. **57**: 29-37.
- Iranzo, M., Aguado, C., Pallotti, C., Cañizares, J.V. and Mormeneo, S. (2002).** The use of trypsin to solubilize wall proteins from *Candida albicans* led to the identification of chitinase 2 as an enzyme covalently linked to the yeast wall structure. *Res Microbiol.* **153**, 227-232.
- Jiang, R.H.Y. (2006).** Footprints of evolution: The dynamics of effector genes in the *Phytophthora* genome. Ph.D. thesis, *Wageningen University, The Netherlands*.
- John Wiley and Sons, 2009 .** Oomycete genetics and genomics: diversity, interactions, and research tools/edited by Kurt Lamour and Sophien Kamoun. p. ; cm. ISBN 978-0-470-25567-4.
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K. and Brul, S. (2002).** Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* **26**: 239–256.

- Kollár, R., Reinhold, B. B., Petrakova, E., Yeh, H. J., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J. C., Klis, F. M. and Cabib. E. (1997).** Architecture of the yeast cell wall. β (1-6)-glucan interconnects mannoprotein, β (1-3)-glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.* **272**: 17762-17775.
- Latge´ J, (2009).** Galactofuranose containing molecules in *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology* **47**: S104–S109.
- Lesage G, Bussey H, (2006).** Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**: 317–343
- Leal JA, Prieto A, Ahrazem O, Pereyra T, Bernabe´ M, (2001).** Cell wall polysaccharides: characters for fungal taxonomy and evolution. *Recent Research Developments in Microbiology* **5**: 235–248.
- Lippman E, Erwin, D.C. and Bartnicki-Garcia, S. (1974).** Isolation and chemical composition of oospore-oogonium walls of *Phytophthora megasperma* var *soaje*. *J. Gen. Microbiol.* **80**: 131-141.
- Madrid, M. P., Di Pietro A. and Roncero, M. I. (2003).** Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Mol. Microbiol.* **47** : 257-266.
- McCreath, K.J., Specht, C.A. and Robbins, P.W. (1995).** Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2544–2548
- McLeod, A., Smart, C.D. and Fry, W.E. (2003).** Characterization of 1,3- β -glucanase and 1-3, 1-4- β -glucanase genes from *Phytophthora infestans*. *Fungal Genet. Biol.* **38**, 250-263.
- Meijer, H.J, van de Vondervoort, P.J, Yin, Q.Y., de Koster, C.G., Klis, F.M., Govers, F., de Groot, P.W. (2006).** Identification of cell wall-associated proteins from *Phytophthora ramorum*. *Mol Plant Microbe Interact.* **19**: 1348-58.
- Mfegue Crescence Virginie, (2012).** Origine et mécanismes de dispersion des populations de *Phytophthora megakarya*, pathogène du cacaoyer au Cameroun. Thèse de Doctorat. Biologie Intégrative des Plantes (BIP). *Centre international d'études supérieures en sciences Agronomiques - Montpellier supagro*. 186pages.
- Moore J.P., Nguema-Ona E., Chevalier L., Lindsey G.G., Brandt W.F., Lerouge P., Farrant J.M., and Driouich A. (2006).** Response of the leaf cell wall to the desiccation in the resurrection plant *Myrtille flabellifolius*. *Plant. Physiol.* **141**: 651-662.
- Nakajima H, Tamari K, Matsuda K, 1977.** A cell wall proteo-heteroglycan from *Piricularia oryzae*: isolation and partial structure. *Biochemical Journal* **82**: 1647–1653.
- Noishiki, Y., Nishiyama, Y., Wada, M. and Kuga, S. (2005).** Complexation of α -chitin with aliphatic amines. *Biomacromolecules.* **4**: 2362-2364.

Nyassé S. (1992). Structure d'une population de *Phytophthora* Sp des cacaoyères Camerounaises atteintes de pourriture brune. Mémoire de diplôme de recherche Universitaire (D.R.U) ENSAT. *Institut National Polytechnique, Toulouse.* 48P.

Nzietchueng samuel. (1983). Une maladie du xanthosoma sagittifolium au Cameroun causée par *Pythium myriotylum*. International Society for Tropical Root Crops. *Africa Branch. ibadan, NG IDRC-221f. CDU: 633.68. ISBN: 0-88936-416-0*

Nzietchueng samuel. (1988). Quelques caractéristiques physiologiques de *Pythium myriotylum*, agent pathogène de la pourriture racinaire du macabo (*xanthosoma sagittifolium*) au Cameroun. Institut de la Recherche Agronomique, B.P. 44 Dschang, CAMEROUN. *VI/lh Symposium of the International Society for Tropical Root Crops, Gosier (Guadeloupe), 1-6 July 1985, Ed. INRA, Paris, 1988.*

Oliver RP, Ipcho SVS (2004) *Arabidopsis* pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens. *Mol Plant Pathol* **5**:347– 352

Ondobo Martine Louise., (2014). Héritabilité de la résistance à *Phytophthora megakarya* (Bras. et Griff.) et des composés bioactifs de quelques clones de cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). Thèse de Doctorat/Ph.D, *Faculté des sciences, Université de Yaoundé I*, 181pages

Opoku, I.Y., Appiah, A.A., Akrofi, A.Y. and Owusu, G.K. 2000. *Phytophthora megakarya* potential threat to the cocoa industry in Ghana. *Ghana Journal of Agricultural Science* **33**:237-248.

Osmond, B.C., Specht, C.A., and Robbins, P.W. (1999). Chitin synthase III: synthetic lethal mutants and "stress related" chitin synthesis that bypasses the CSD3/CHS6 localization pathway. *PNAS.* **96**: 11206-11210.

Perfect SE, Green JR, O'Connell RJ (2001) Surface characteristics of necrotrophic secondary hyphae produced by the bean anthracnose fungus, *Colletotrichum lindemuthianum*. *Eur J Plant Pathol* **107**:813–819

Ray B., Loutier-Bourhis C., Condamine E., Driouich A., and Lerouge P. (2004). Structural investigation of hemicellulosic polysaccharides from *Argania spinosa*: characterization of novel xyloglucan motif. *Carbohydrate Res.* **339**: 201-208.

Roetschi A. (2001). *Arabidopsis-Phytophthora*, un pathosystème modèle pour la caractérisation d'une interaction entre une plante et un pathogène oomycète. Thèse de Doctorat, *univer. de Fribourg (suisse)*.81p.

Ruiz-Herrera J, (1992). Fungal Cell Wall: structure, synthesis, and assembly. *CRC Press, Boca Raton, Florida.*

- Ruiz-Herrera, J. and San-Blas, G. (2003).** Chitin synthesis as target for antifungal drugs. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **3**: 77-91.
- Ruiz-Herrera, J., Elorza, M.V., Valentín, E. and Sentandreu, R. (2006).** Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res. Rev* **6** : 14-29.
- Saxena, I.M. and Brown, R.M. (2005).** Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts. *Ann Bot (Lond). Rev* **96**: 9-21.
- Smits, G.J., Van den Ende, H., and Klis, F.M. (2001).** Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* **147**: 781-794.
- Sonia, M. and Dietrich, M. (1973).** Carbohydrates from the hyphal walls of some oomycetes. *Biochimica. Biophysica. Acta.* **313** : 95-98.
- Sonja V., Shauna S., and Chris S. (2004).** The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends. Plant. sci.* **9**: 203-209.
- Thines M, Kamoun S. (2010).** Oomycete–plant coevolution: recent advances and future prospects. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 427-433.
- Tom Kucharek & Dave Mitchell (2000).** Diseases of agronomic and Vegetable crops caused by *Pythium*. University of Florida, Gainesville FL 32611. *Plant Pathology Fact Sheet.* PP-53.
- Vink, E., Rodriguez-Suarez, R. J., Gerard-Vincent, M., Ribas, J. C., De Nobel, H., van den Ende, H., Duran, A., Klis, F. M. and Bussey. H. (2004).** An in vitro assay for (1-6)- β -Dglucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **2**: 1121-1131.
- York W.S., Darvill A.G., McNeil M., and Albersheim P. (1985a).** 3-deoxy-manno-2-octulosonic acid (KDO) is a component of rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydrate Res.* **138**: 109-126.
- Zevenhuizen, L. P. and Bartnicki-Garcia, S. (1969).** Chemical structure of the insoluble hyphal wall glucan of *Phytophthora cinnamomi*. *Biochemistry.* **8**, 1496-1502

ANNEXES

Annexe 1 Composition du milieu V8

- 20% de jus de légumes V8 ;
- 0,04% de carbonate de calcium ;
- 4% d'agar.

Annexe 2 Composition du milieu liquide (Extrait de malt: Malt Broth Mehrlich)

- 5g extrait de malt (Difco);
- 15g glucose;
- 1,0g peptone;
- 1,0g KH₂P₀₄;
- 0,5g MgSO₄.

Annexe 3 Pourcentage des monosaccharides de la fraction pariétale totale (AIS)

	Pourcentages (%) molaires des différents monosaccharides			
	<i>Phytophthora megakarya</i> Jour 3	<i>Phytophthora megakarya</i> Jour 9	<i>Pythium myriotylum</i> Jour 3	<i>Pythium myriotylum</i> Jour 9
Ara	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Rha	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Fuc	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Xyl	0,85±0,05	0,73±0,07	0,96±0,27	0,77±0,03
Man	12,81±0,17	12,33±0,16	13,10±0,36	13,41±0,44
Gal	14,14±0,38	12,59±0,52	17,09±0,96	16,40±1,01
GalUA	1,44±0,27	0,98±0,21	1,99±0,97	1,55±0,62
NAcGlc	4,82±0,38	4,14±0,31	5,31±0,61	5,37±0,27
Glc	63,20±0,41	66,22±0,35	58,95±1,22	59,66±0,88
GlcUA	2,74±0,27	3,01±0,08	2,61±0,27	2,85±0,27

Annexe 4 Pourcentage des monosaccharides de la fraction pariétale soluble en milieu alcalin (ALS)

	Pourcentages (%) molaires des différents monosaccharides			
	<i>Phytophthora megakarya</i> Jour 3	<i>Phytophthora megakarya</i> Jour 9	<i>Pythium myriotylum</i> Jour 3	<i>Pythium myriotylum</i> Jour 9
Ara	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Rha	3,80±0,28	3,80±0,28	4,21±0,11	3,06±2,05
Fuc	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Xyl	2,43±0,25	2,35±0,28	2,71±0,06	2,07±1,40
Man	12,90±0,71	12,62±0,43	13,88±0,94	14,32±1,70
Gal	17,99±0,50	15,39±0,38	20,71±0,32	21,65±0,50
GalUA	1,63±0,31	1,48±0,31	1,64±0,59	1,88±1,30
NAcGlc	1,16±2,32	5,23±0,14	4,25±2,84	1,28±2,57
Glc	57,02±1,19	56,06±0,48	49,51±1,45	52,58±3,73
GlcUA	3,08±0,16	3,06±0,10	3,10±0,08	3,15±0,32

Annexe 5 Pourcentages des monosaccharides de la fraction pariétale insoluble en milieu alcalin (ALI)

	Pourcentages (%) molaires des différents monosaccharides			
	<i>Phytophthora megakarya</i> Jour 3	<i>Phytophthora megakarya</i> Jour 9	<i>Pythium myriotylum</i> Jour 3	<i>Pythium myriotylum</i> Jour 9
Ara	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Rha	0,61±0,05	0,50±0,36	0,35±0,41	0,59±0,40
Fuc	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Xyl	0,47±0,02	0,51±0,10	0,37±0,25	0,54±0,04
Man	4,13±0,19	6,04±0,85	4,04±0,25	4,49±0,79
Gal	12,83±0,58	12,91±1,23	11,74±0,41	11,70±0,76
GalUA	1,02±0,38	1,94±0,39	1,29±0,61	1,27±0,21
NAcGlc	8,49±0,30	7,05±0,62	9,85±0,83	10,90±0,83
Glc	70,93±1,30	68,87±2,05	71,25±0,61	69,11±0,72
GlcUA	1,52±0,17	2,18±0,19	1,09±0,18	1,40±0,20