



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Microbiologie.

قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Microbiologie

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie fongique.

Intitulé :

Isolement et identification d'*Aschocyta pisi* Lib. agent pathogène de l'antracnose chez le petit pois (*Pisum sativum* L.) et moyens de lutte

Préparé par : Djaout Chiraz

Le : 04/10/2020

Meziadi Khaoula

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : BOULTIFAT Linda (MCB - UFM Constantine).

Rapporteur : MERGOUD Lilia (MAA- UFM Constantine).

Examinatrice : ZERMANE Férial (MAA - UFM Constantine).

Année universitaire
2019- 2020

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions notre Dieu, tout puissant, qui nous a éclairé le bon chemin et qui nous a aidé à réaliser ce travail.

Nous tenons à remercier notre encadreur Madame **MERGOUD Lilia** maitre assistante à l'université Frères Mentouri Constantine qui nous a guidé avec patience et gentillesse et nous a fait profiter de sa grande expérience ainsi que de ses précieuses remarques qui ont grandement contribué à améliorer la qualité de ce mémoire. Notre travail avec elle nous a permis d'acquérir énormément de choses. Qu'elle soit ici assurée de notre profonde gratitude et de notre très grand respect.

De même, nous remercions très sincèrement l'ensemble des membres de jury qui nous ont fait le grand honneur d'avoir accepté de juger notre travail.

Nous remercions Madame **BOULTIFAT Linda** maitre de conférences à l'Université Frères Mentouri Constantine pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant la présidence de ce jury. Qu'elle trouve ici l'assurance de notre profonde gratitude.

Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à Madame **ZERMANE Ferial** maitre assistante à l'Université Frères Mentouri Constantine pour avoir accepté d'être examinatrice de ce travail et pour le temps qu'elle a investi à l'évaluer malgré ses nombreuses obligations.

Nous remercions également Monsieur **Nabil Boudersa** pour son guide précieux et ses conseils judicieux. Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde et sincère reconnaissance.

Dédicaces de Chiraz

Je dédie ce modeste travail

A l'être qui quoique j'écrive, je ne parviendrai jamais à remercier assez, l'être qui a toujours été derrière les plus grands évènements de ma vie. Son amour sans limite m'a toujours réconforté et poussé en avant. Je suis très certaine qu'il n'existe aucun mot qui a l'ampleur de cet amour ; alors je lui dis tout simplement : merci maman.

A ma chère grande mère que Dieu la garde pour nous.

A ma chère tante NASSIRA pour son aide et son soutien. Affectueuse reconnaissance

A mon frère unique MOHAMED AMDJED, bonne réussite dans ses études

A mes chères oncles YUCEF et MOHAMED pour leurs encouragements.
Sincère gratitude.

A toutes mes amies et collègues.

Chiraz

Dédicaces de Khaoula

C'est avec respect et gratitude que je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma sympathie à :

- Mon cher papa, Monsieur MEZIADI AMAR, qui a toujours cru en moi et a mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour que je réussisse dans mes études.

- Ma chère mère, TABET FADILA, que je ne cesse de remercier pour tout ce qu'elle m'a donné. Elle est la première à m'encourager à aller si loin dans les études. Elle m'a inculqué le goût du travail, de la rigueur et de l'ambition.

Je dédie ce travail aussi

A mes frères YASSER, AYMEN et le chouchuté IMED, qui m'ont soutenu avec amour et tendresse pendant ce travail pour leur très grande "gentillesse" et leur constantes bonne humeur. Meilleurs vœux de succès dans vos études.

A ma sœur AYA, pour son aide, soutiens et encouragements. Sincère gratitude.

A Ma grand-mère, ton souvenir reste à jamais gravé dans ma mémoire.

Toute la famille MEZIADI et TABET

Toutes mes amies et collègues.

Khaoula

Résumé

L'anthracnose du petit pois causée par le champignon *Ascochyta pisi* Lib. est l'une des maladies graves dans le monde, provoquant des symptômes qui apparaissent sur toutes les parties aériennes de la plante adulte de petits pois (*Pisum sativum* L.) ; avec des lésions entourées d'un anneau chlorotique jaune qui se transforme en tâches brun foncé sur les feuilles et nécrotique avec un centre rougeâtre sur les gousses, ce qui les rend impropres à la consommation. Notre travail a porté sur l'étude des techniques d'isolement et d'identification d'agent pathogène ainsi que les moyens de lutte pour empêcher le développement du germe après une invasion réussie. La lutte contre l'*Ascochyta pisi* Lib. peut être effectuée biologiquement par le mécanisme d'antagonisme, soit par l'utilisation des fongicides qui préviennent les atteintes, ou par l'introduction de gènes résistants au niveau de la plante pour lui donner un pouvoir de résistance

Mots clés : *Pisum sativum* L., Anthracnose, *Ascochyta pisi* Lib., Isolement, Lutte.

Abstract

Pea anthracnosis caused by the fungus *Ascochyta pisi* Lib. is one of the serious diseases in the world, causing symptoms that appear on all aerial parts of the adult pea plant (*Pisum sativum* L.); with lesions surrounded by a yellow chlorotic ring which turns to dark brown spots on the leaves and necrotic with a reddish center on the pods, making them unfit for consumption. Our work has focused on the study of pathogen isolation and identification techniques as well as control methods to prevent the development of the germ after a successful invasion. The fight against *Ascochyta pisi* Lib. can be carried out biologically either by the mechanism of antagonism, or by the use of fungicides which prevent the attacks, or by the introduction of resistant genes at the level of the plant to give it a power of resistance.

Keywords: *Ascochyta pisi* Lib., Anthracnosis, Isolation, Identification, Control.

ملخص

Anthracnose البزلاء يسببها الفطر *Ascochyta pisi* Lib. و هو احد الأمراض الخطيرة في العالم, تظهر أعراضه على جميع الأجزاء الهوائية لنبات البزلاء (*Pisum sativum* L.) و تكون الأعراض على شكل بقع مصفرة تتحول إلى بقع بنية داكنة على الأوراق و نخرية مع مركز محمر على الثمار مما يجعلها غير صالحة للاستهلاك بتركز عملنا على دراسة تقنيات عزل وتحديد العوامل الممرضة وكذلك طرق التحكم لمنع تطور الجراثيم بعد غزو ناجح. مكافحة ضد *Ascochyta pisi* Lib. يمكن إجراؤها بيولوجيًا إما عن طريق آلية العداء ، أو باستخدام مبيدات الفطريات التي تمنع الهجمات ، أو عن طريق إدخال جينات مقاومة على مستوى النبات لمنحه قوة مقاومة.

الكلمات المفتاحية : *Ascochyta pisi* Lib.، Anthracnose، العزل، التحديد، المكافحة.

Liste des abréviations

A. pisi Lib.	: <i>Ascochyta pisi</i>
Eurasie	: Europe + Asie
j	: Jour
h	: Heure
min	: Minute
ml	: Millilitre
mg	: Milligramme
ha	: Hectare
qx	: Quintaux
av J-C	: Avant Jesus Christ
XVI^e siècle	: 16 ^e siècle
S	: Sépale
P	: Pétale
C	: Carpelle
E	: Etamine
PDA	: Milieu pomme de terre dextrose agar.
FAO	: organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
PTYV	: <i>Pea Tip Yellowing Virus</i>
PEMV	: <i>Pea Enation Mosaic Virus</i>
PCMV	: <i>Pea Common Mosaic Virus</i>
PSbMV	: <i>Pea Seed-borne Mosaic Virus</i>
CYVV	: <i>Colver Yellow Vein Virus</i>

Liste des figures

Figure 01 :	Culture des petits pois	P 3
Figure 02 :	Système racinaire du petit pois	P 4
Figure 03 :	Feuille et fleur du petit pois	P 5
Figure 04 :	Fruit du petit pois	P 5
Figure 05 :	Diagramme floral du petit pois	P 6
Figure 06 :	Répartition de la production mondiale du pois frais	P 7
Figure 07 :	Symptômes de quelques maladies de petit pois	P 11
Figure 08 :	Anthracnose (<i>Ascochyta pisi</i> Lib.), sur les feuilles et les gousses de pois (<i>Pisum sativum</i> L.).	P 16
Figure 09 :	Colonies d' <i>A. pisi</i> Lib., face supérieure (à gauche) et face inférieure (à droite)	P 18
Figure 10 :	Morphologie des organes de reproduction sexuée et asexuée chez <i>Ascochyta pisi</i> Lib.	P 19
Figure 11 :	Symptôme d' <i>Ascochyta pisi</i> Lib. sur feuilles de petit pois	P 20
Figure 12 :	Symptôme d' <i>Ascochyta pisi</i> Lib. sur la tige de petit pois	P 21
Figure 13 :	Symptôme d' <i>Ascochyta pisi</i> Lib. sur les gousses de petit pois	P 21
Figure 14 :	Cycle de la maladie de l' <i>Ascochyta pisi</i> Lib. des petits pois de grande culture	P 23
Figure 15 :	Isolement du champignon à partir des gousses (A : recto, B : verso).	P 26

Figure 16 :	<i>Ascochyta pisi</i> Lib. sous microscope	P 28
Figure 17 :	Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de <i>Trichoderma harzianum</i>	P 31
Figure 18 :	Confrontation directe entre <i>Ascochyta pisi</i> Lib. et <i>Trichoderma harzianum</i> sur milieu PDA	P 33
Figure 19 :	Test de confrontation directe pour le témoin sur milieu PDA	P 34
Figure 20 :	Structure de penconazole	P 36
Figure 21 :	Structure de difénoconazole	P 36

Liste des tableaux

Tableau 01 :	Les composants pour 100 g du petit pois cuit	P 8
Tableau 02 :	Les vitamines pour 100 g du petit pois cuit	P 9
Tableau 03 :	Les minéraux et oligo-éléments pour 100 g du petit pois cuit	P 9
Tableau 04 :	Variétés de petit pois	P 10
Tableau 05 :	Les maladies de petit pois	P 12
Tableau 06 :	Effet des milieux de culture sur la croissance mycélienne	P 25
Tableau 07 :	Modes d'action et mécanismes d'antagonisme	P 32
Tableau 08 :	Les principales familles des fongicides utilisées	P 35
Tableau 09 :	Action des fongicides utilisés sur la croissance mycélienne d' <i>Ascochyta pisi</i> Lib.	P 38

TABLE DES MATIERES

Liste des abreviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : LA PLANTE HOTE : PETIT POIS	3
I- GENERALITES	3
II- DESCRIPTION BOTANIQUE.....	4
II-1 Système racinaire.....	4
II-2 Appareil végétatif	4
1. Tige	4
2. Feuilles	4
3. Fleurs.....	5
4. Fruit.....	5
5. Diagramme floral.....	5
III-POSITION SYSTEMATIQUE.....	6
IV- ORIGINE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE	6
V- PRODUCTION DES PETITS POIS	8
V-1- Production en Algérie.....	8
V-2- Production dans la wilaya de Constantine	8
VI- COMPOSITION BIOCHIMIQUE ET VALEUR NUTRITIONNELLE	8
VII- LES VARIETES DU PETIT POIS	10
VIII- LES MALADIES ET LES RAVAGEURS DE PETIT POIS	11
VIII-1-Les maladies de petit pois.....	12
VIII-2- Les ravageurs de petit pois	14
CHAPITRE 2 : L'AGENT PATHOGENE ET TECHNIQUE D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION	16
PARTIE 1 : L'AGENT PATHOGENE (<i>ASCOCHYTA PISI</i> LIB.).....	16
I- DEFINITION D' <i>ASCOCHYTA PISI</i> LIB.	16
II-HISTORIQUE ET TAXONOMIE.....	17
III-POSITION SYSTEMATIQUE.....	17
IV- DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE.....	18
IV-1- Caractères macroscopiques	18
IV-2 Caractères microscopiques	18
V- SYMPTOMOLOGIE.....	20
V-1- Sur les feuilles.....	20
V-2- Sur les tiges.....	21
V-3- Sur les gousses	21
VI- ÉCOLOGIE DE L'ANTHRACNOSE (<i>ASCOCHYTA PISI</i> LIB.).....	22

VII-CYCLE DE LA MALADIE.....	22
VIII- MECANISME D'INFECTION	23
PARTIE 2 : TECHNIQUES D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION	24
I- OBJECTIF.....	24
II- LES MILIEUX DE CULTURES	24
1. Le milieu Mathur	24
2. Le milieu PDA (Pomme de terre Dextrose Agar)	24
3. Le milieu CzapekDox Agar.....	24
III- ISOLEMENT.....	25
IV- PURIFICATION.....	26
□ Culture monospore.....	27
V- IDENTIFICATION	27
1. L'étude macroscopique	27
2. L'étude microscopique.....	28
VI- CONSERVATION DES ISOLATS	29
CHAPITRE 3 : LES MOYENS DE LUTTE	30
I-LUTTE CULTURALE.....	30
II- LUTTE BIOLOGIQUE	30
II-1 Mode d'action de Trichoderma	31
II-2 Activité antagoniste de Trichoderma harzianum vis-à-vis d'Ascochyta pisi Lib.	33
III- LUTTE CHIMIQUE	35
III-1 Les fongicides utilisés	36
1. Le penconazole	36
2. Le difenoconazole.....	36
III-2 Mode d'action des fongicides	37
III-3 Etude de l'action des fongicides sur la croissance mycélienne d'Ascochyta pisi Lib. in vitro.....	37
IV- LUTTE GENETIQUE	38
CONCLUSION GENERALE	39
ANNEXES	40
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	42

Introduction

Introduction

Le pois est cultivé depuis l'époque néolithique et a accompagné les céréales dans l'apparition de l'agriculture au Proche-Orient. Il était dans l'Antiquité et au Moyen Âge un aliment de base en Europe et dans le bassin méditerranéen. De nos jours, sa culture est pratiquée dans les cinq continents, particulièrement dans les régions de climat tempéré d'Eurasie et d'Amérique du Nord.

La production mondiale en pois a atteint son optimum en 1990 avec une production qui avoisine 16,5 millions de tonnes (**FAOSTAT-Dat, 2004**). A partir de l'année 2000, la production mondiale s'est stabilisée autour de 10 millions de tonnes.

En Algérie, les conditions climatiques et du sol sont très favorables à sa culture, laquelle s'étend sur une superficie de 21200 ha avec une production annuelle de 632900 qx, soit un rendement de 29,9 qx/ha (**DSASI, 2001**).

Malheureusement, la culture de pois peut subir des ravages par une large gamme d'agents pathogènes comprenant des champignons, des bactéries, des virus, des insectes et des nématodes qui sont responsables de nombreuses maladies constituant un danger réel à cette culture.

Parmi les maladies aériennes, l'anthracnose causée par *Ascochyta pisi* Lib. est l'une des maladies les plus graves affectant les cultures de pois. Ce champignon *Ascochyta pisi* Lib., attaque les organes verts d'un très grand nombre de légumineuses d'où **Stone (1912)** qui a étudié la biologie du champignon, donne une liste importante de plantes hôtes, dont la principale est : le petit pois (*Pisum sativum* L.). (**Terbeche et al., 2015**)

Cette maladie peut entraîner une réduction significative à la fois sur le rendement et sur la qualité des petits pois, d'où une connaissance approfondie de ce champignon s'impose afin de faciliter les travaux de lutte contre ce parasite.

Notre travail a pour objectif de mieux connaître le comportement d'*Ascochyta pisi* Lib sur le petit pois (*Pisum sativum* L.) et d'étudier les moyens de lutte pour empêcher le développement du pathogène après une invasion réussite.

Les axes de ce mémoire s'articulent autour de trois chapitres :

Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique relative à la plante hôte *Pisum sativum* L. ;

Le deuxième chapitre porte sur une synthèse bibliographique relative à l'*Ascochyta pisi* Lib., agent responsable de l'antracnose du petit pois et aux techniques de son isolement et identification ;

Le troisième chapitre concerne les différents moyens de lutte contre *Ascochyta pisi* Lib.

En fin, nous terminons par une conclusion générale récapitulant les informations acquises lors de notre recherche.

Vue les circonstances du confinement dues au coronavirus (covid-19), la réalisation de la partie pratique de ce mémoire a été interrompue.

Chapitre 01

La plante hôte : petit pois

I- Généralités

Les Légumineuses sont considérées parmi les plus importants groupes de plantes pour l'homme, servant de cultures, de fourrages, d'engrais verts et produisant un grand nombre de composés utiles comme des médicaments, des poisons, des teintures ou des parfums. Elles sont représentées dans presque tous les milieux terrestres (excepté en Antarctique) (**Ildis, 2001**).

Les légumineuses alimentaires en Algérie ont toujours occupé, sur le plan de la superficie, le troisième rang après les céréales et les fourrages. Leur superficie soit de l'ordre de 90 mille ha représentant 0,21% de la superficie agricole totale en 2014. Parmi les espèces les plus cultivées, le petit pois (**MADR, 2014**).

Le petit pois ou *Pisum sativum* L. (**Figure 01**) est une plante de la famille des Fabaceae (légumineuses), sous famille de faboïdées et du genre *Pisum*. Elle est annuelle, originaire de l'Asie centrale (Afghanistan et Inde) et sa culture est très ancienne. (**Free, 1993; Pouvreau, 2004**). C'est une plante autogame mais des taux d'allogamie peuvent être observés chez certains cultivars (**Haskell, 1943**). Il est considéré comme un légume sec riche en énergie et en protéines ce qui a conduit à une extension rapide de sa culture dans le monde, particulièrement dans les régions d'Eurasie et d'Amérique du nord (**Coutin R, 2004**).



Figure 01 : Culture des petits pois (**Gerbeaud, 2018**).

II- Description botanique

II-1 Système racinaire

Le pois dispose en effet d'un système racinaire ramifié et puissant avec des racines secondaires voir tertiaires. L'enracinement est assez développé puisque les racines peuvent atteindre 60 cm de profondeur jusqu'à un mètre en fin floraison et dans des conditions de sol favorable. On peut noter la présence de nodosités qui représentent un siège de la fixation symbolique de l'azote atmosphérique (**Figure 02**).

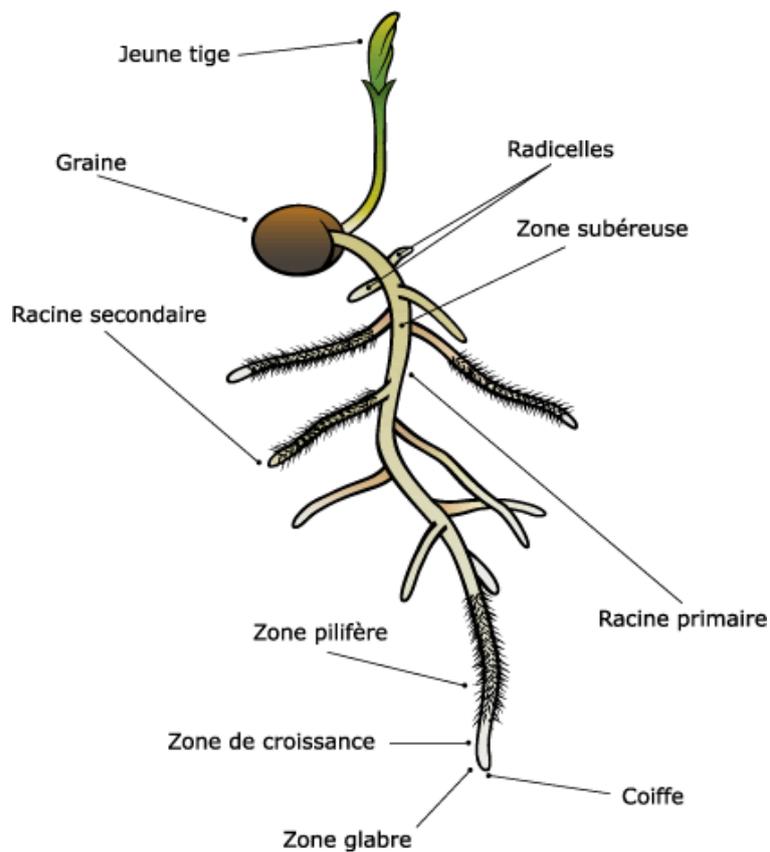


Figure 02 : Système racinaire du petit pois (Lambert, 2016)

II-2 Appareil végétatif

- 1. Tige** : L'appareil aérien est constitué d'une tige principale et de ramifications issues des bourgeons latéraux. Elle est herbacée, grêle et creuse, cylindrique ou légèrement anguleuses, d'une hauteur variable de 50 cm à 2 m.
- 2. Feuilles** : Les feuilles se prolongent par des vrilles de plusieurs centimètres de long. Elles sont composées de 4 à 6 folioles à disposition alterne, elles ont différentes

couleur du vert jaune au vert bleu foncé. Les folioles sont entières ou plus ou moins dentées, de forme ovale ou elliptique, leur extrémité est arrondie et crénelée, pointue ou tronquée selon les variétés (**Figure 03**).

- 3. Fleurs** : Elles sont de type « papilionacé », sont zygomorphes, à ovaire supère et cléistogames. Elles sont blanches ou avec l'étendard d'un blanc bleuâtre et les ailes d'un violet noir (**Figure 03**). Les fleurs ont une taille de 3 à 4 cm de long, elles naissent à l'aisselle des feuilles, les pédoncules de longueur variable supportent une à trois fleurs (**Elzebroek et Wind, 2008**).



Figure 03 : Feuille et fleur du petit pois (**Wiki media, 2008**)

- 4. Fruit** : Il est de type gousse longue de 4 à 11cm, la gousse contient 5 à 10 grains. Les grains sont globuleux, lisses et non marbrés, ils possèdent des réserves en amidon et en protéines (**Figure 04**).



Figure 04 : Fruit du petit pois (**Sante pratique, 2019**)

5. Diagramme floral

La formule complète du diagramme floral est la suivante : $5 S + 5 P + (9 + 1) E + 1 C$ (**Figure 05**).

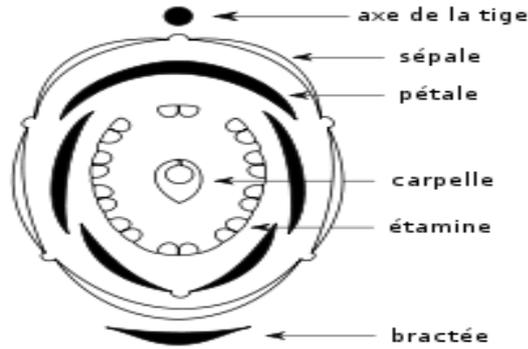


Figure 05: Diagramme floral du petit pois (Wiki media, 2008).

III-Position systématique

<u>Règne</u>	Plantae
<u>Sous-règne</u>	Tracheobionta
<u>Embranchement</u>	Spermatophyta
<u>Sous Embranchement</u>	Magnoliophyta
<u>Classe</u>	Magnoliopsida
<u>Sous-classe</u>	Rosidae
<u>Ordre</u>	Fabales
<u>Famille</u>	Fabaceae
<u>Genre</u>	Pisum
<u>Espèce</u>	<i>Pisum sativum</i> L.

IV- Origine et répartition géographique

L'origine et les ancêtres de *Pisum sativum* L. sont mal connus. La région méditerranéenne, l'Asie centrale et occidentale et l'Ethiopie ont été envisagés comme centres d'origine. Récemment, la FAO a désigné l'Ethiopie et l'Asie occidentale comme centres de diversité, avec des centres secondaires dans le sud de l'Asie et la région méditerranéenne. L'utilisation du pois dans le Croissant fertile est attestée par des données archéologiques datant de 8000 av. J.-C. Le pois semble avoir été d'abord cultivé en Asie, d'où il s'est diffusé en Europe, en Chine et en Inde. Dans l'antiquité, les auteurs grecs et romains ont fait état de sa culture comme légume sec et plante fourragère. Le pois était déjà bien connu dans les régions montagneuses de l'Afrique centrale et orientale avant l'arrivée des Européens et, vers 1860,

c'était une culture vivrière importante et bien établie au Rwanda et dans le sud-ouest de l'Ouganda. La consommation des gousses fut décrite pour la première fois aux Pays-Bas et en France au XVI^e siècle, et l'emploi des graines immatures comme légume débuta en Europe un siècle plus tard.

Actuellement, on trouve *Pisum sativum* L. dans tous les pays tempérés et dans la plupart des hautes terres tropicales. Le pois sec est cultivé sur de vastes territoires dans les hautes terres de l'Afrique centrale (partie est) et orientale (en Ethiopie en particulier) ainsi qu'en Afrique australe. Dans certaines régions du Rwanda et de l'Ouganda, c'est le principal légume sec. Le pois sec n'est pratiquement pas cultivé en Afrique de l'Ouest. En Afrique, le petit pois et le pois mangetout sont surtout considérés comme des produits exotiques. Ils ont une importance au niveau régional, le pois mangetout davantage dans les pays francophones et le petit pois surtout dans les pays anglophones. On peut se procurer des petits pois en conserve importés dans toutes les épiceries (**Plant Use, 2020**).

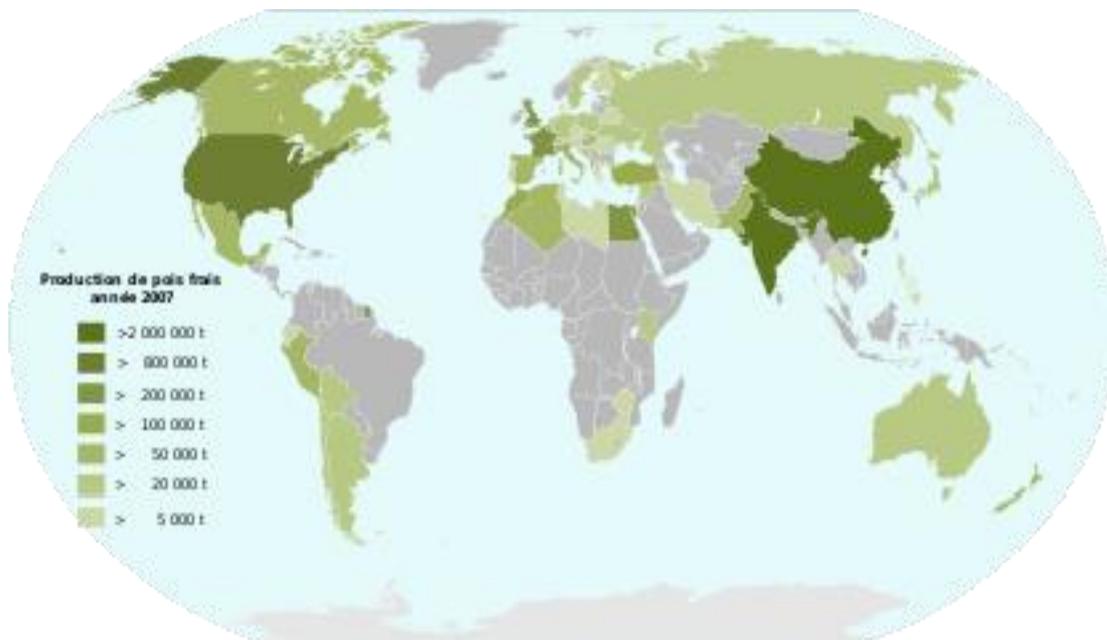


Figure 06 : Répartition de la production mondiale du pois frais (**FAO, 2009**).

V- Production des petits pois

V-1- Production en Algérie

En Algérie le pois a été cultivé avant 1830 dans les jardins et les champs en Kabylie (**Loumont et Chevassus, 1960**). La culture a pris un développement important en 1945, elle a connue par la suite un essor remarquable de 1947 à 1952. En 1980, 10800 ha ont été consacrés à cette culture. Durant cette dernière décade ; c'est en 1993 qu'on a enregistré la superficie la plus importante avec 20800 ha alors que le rendement le plus important a été enregistré en 2001 sur une superficie de 19970 ha (**FAOSTAT, 2004**). En 2009, cette superficie passe à 28724 ha avec une production annuelle de 1029707 qx, soit un rendement de 35.8 qx/ha (**MADR, 2009**).

Les principales wilayas productrices sont Mascara, Boumerdes, Biskra et Tlemcen

V-2- Production dans la wilaya de Constantine

Dans la wilaya de Constantine, la surface réservée, au titre de cette campagne agricole, aux légumes secs, toutes espèces confondues, a dépassé 6.000 ha dont 140 ha aux petits pois (**CA, 2018**).

VI- Composition biochimique et valeur nutritionnelle

Pour chaque nutriment, les tableaux 01, 02 et 03 apportent une information sur la quantité moyenne ainsi que les quantités minimum et maximum pour 100 g net de petits pois cuits (**Ciquel, 2017**).

Tableau 01 : Les composants pour 100 g du petit pois cuit :

Composants	Qté.	Min – Max
Eau	82.9 g	77.9 - NC g
Protéines	5.8 g	5.19 - NC g
Lipides	0.87 g	0.22 - NC g
Acides gras saturés	0.21 g	0.039 - 0.22 g
Glucides	4.7 g	-
Sucre	1.8 g	-
Fibres	5.8 g	5.5 - 6.2 g

Tableau 02 : Les vitamines pour 100 g du petit pois cuit

Vitamines	Qté.	Min – Max
Provitamine A Béta-carotène	414 µg	NC - 470 µg
Equivalent Vitamine A	69 µg	NC - 78.34 µg
Vitamine B1	0.13 mg	NC - 0.26 mg
Vitamine B2	0.05 mg	NC - 0.15 mg
Vitamine B3	0.4 mg	NC - 2.02 mg
Vitamine B5	-	NC - 0.15 mg
Vitamine B6	-	NC - 0.22 mg
Vitamine B9	65.6 µg	63 - NC µg
Vitamine C	1.8 mg	NC - 14.2 mg

Tableau 03 : Les minéraux et oligo-éléments pour 100 g du petit pois cuit

Minéraux et oligo-éléments	Quantité	Min – Max
Calcium	32.7 mg	25.7 - 46.2 mg
Cuivre	0.14 mg	0.1 - 0.18 mg
Fer	1.17 mg	0.15 - 1.89 mg
Iode	-	-
Magnésium	31.9 mg	23.2 - 42.5 mg
Manganèse	0.32 mg	0.1 - 0.53 mg
Phosphore	96 mg	NC - 117 mg
Potassium	135 mg	89.6 - 271 mg
Sodium	7.1 mg	3 - NC mg
Zinc	0.8 mg	0.51 - 1.19 mg

VII- Les variétés du petit pois

Tableau 04: Variétés de petit pois (Messiaen, 2010)

Variétés	Hauteur (cm)	Couleur de grain	Durée de végétation (jours)	Caractères variétaux
Express à longue cosse	90	Vert rond	71	Gousses longues 8 à 10 grains
Roi des conserves	140	Vert rond	78	Gousses arquées
Serpette guilloteaux	150	Blanc rond	81	Gousses arquées
Cadoz	Nain	Blanc rond	80	Grains très petits
Douce provenance	Nain	Vert rond	69	Gousses longues 7 à 9 grains
Petit provençal	Nain	Vert rond	69	Gousses arquées
Proval	Nain	Vert rond	65	Le plus précoce
Arkel	Nain	Vert ridé	70	Gousses longues pointues
Merveille de Kelvedon	Nain	Vert ridé	68	Gousses fines très longues
Onward	Nain	Vert ridé	79	Gousses résistantes Oïdium
Bayard	Nain	Vert ridé	70	Type afila
Surgévil	Nain	Vert ridé	85	Grains très sucrés
Caroubay de Maussane	95	Gris Fleur mauve	95	Mangetout à rames
Corne de Bélier	150	Blanc	90	Mangetout à rames

VIII- Les maladies et les ravageurs du petit pois

Elles sont des maladies parasitaires provoquées par divers organismes vivants (bactéries, virus, champignons) qui affectent le pois cultivé (*Pisum sativum* L.). Relativement nombreuses, ces maladies peuvent être spécifiques de l'espèce *Pisum sativum* L., ou touchent d'autres espèces proches (en particulier la fève) et plus largement les légumineuses, voir une multitude d'espèces végétales, cultivées ou non. La plante peut aussi présenter divers symptômes (**Figure 07**) dus soit à des attaques de ravageurs (insectes, nématodes), soit à des phénomènes abiotiques (carences du sol, phénomènes météorologiques) qui peuvent évoquer au premier abord ceux des maladies (**Agrobaf, 2019**).

Ces maladies se transmettent par diverses voies : par les organismes vivant dans le sol par des insectes ravageurs qui créent des blessures favorisant l'arrivée des spores des champignons, ou qui inoculent des germes (virus) par les semences lorsqu'elles sont infectées, par les restes des précédentes cultures. Les plantes poussant dans le voisinage peuvent constituer des sources de contamination, qu'il s'agisse de cultures ou de plantes sauvages (**Agrobaf, 2019**).



Figure 07 : Symptômes de quelques maladies de petit pois (**Terres Innovai, 2020**).

VIII-1-Les maladies de petit pois

Tableau 05 : Les maladies de petit pois (Messiaen *et al.*, 1991 ; Chaux et Foury, 1994 ; Brink et Belay, 2006)

Les maladies de petit pois	Les symptômes	Les moyens de lutte
<p>Graisse bactérienne du pois</p> <ul style="list-style-type: none"> (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Pisi</i>) 	<p>-Des taches huileuses sur les organes aériens, qui s'agrandissent en éventail et prennent une couleur brun clair sur les feuilles, et forment des taches brunes sur les gousses.</p>	<p>-Semences saines (élimination des lots infectés par le test ELISA). -Pas de moyen de lutte chimique, hormis les traitements cupriques appliqués en préventif (si gel ou grêle) ou dès l'apparition des premiers symptômes.</p>
<p>Viroses du pois</p> <ul style="list-style-type: none"> Jaunisse apicale du pois (PTYV) Mosaïque énation(PEMV) Mosaïque commune du pois (PCMV) Mosaïque transmise par les grains de pois (PSbMV) 	<p>-Jaunissement de la partie supérieure des plantes. -Feuilles petites, érigées et cassantes.</p> <p>-Eclaircissement des nervures et taches translucides. -Déformation des tiges, feuilles et gousses. -Rabougrissement des extrémités de tiges. -Excroissances irrégulières (appelées énation).</p> <p>-Symptômes variables selon la race de virus et la variété de pois. -Typiquement : mosaïque avec plages vertes et jaunes. -Eclaircissement des nervures des feuilles et stipules. -Réduction de la taille des plantes touchées.</p> <p>-Peu visible sur les plantes : légère chlorose, bord des feuilles enroulé, faible mosaïque parfois. -Retard de maturité</p>	<p>-Contrôle efficace et rapide des populations de pucerons, vecteurs de la maladie. -Test ELISA permettant d'identifier le PeaSeed-borne Mosaic Virus sur les semences. -La résistance génétique existe pour la mosaïque commune et la mosaïque énation mais elle est peu développée.</p>

<ul style="list-style-type: none"> • Virus de la veine jaune du trèfle (CYVV) 	<p>-Nécrose des tiges, feuilles, stipules et gousses qui peuvent se généraliser à toute la plante.</p> <p>- Aplatissement des gousses et avortements.</p>	
<p>Anthracnoses :</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Ascochyta pisi</i> Lib. • <i>Mycosphaerella pinodes</i> (<i>Ascochyta pinodes</i>) • <i>Phoma medicaginis</i> (<i>Ascochyta pinodella</i>) 	<p>-Lésions beiges à bordures foncées, avec au centre, de nombreuses ponctuations noires (pycnides).</p> <p>-Petites ponctuations noires pouvant s'agrandir et se rejoindre pour former de larges taches foncées. Attaques fréquentes à la base des tiges (nécroses noirâtres).</p> <p>- Une nécrose du collet et la présence d'un manchon brun violacé au niveau des entre nœuds inférieurs de la tige des jeunes plantes. En cours de végétation, apparaissent sur feuilles et tiges, des taches de couleur brun clair, Sur gousses et grains, les taches sont délimitées, de couleur marron rougeâtre, en dépression sur l'épiderme de la gousse. Les grains contaminés présentent des taches sombres.</p>	<p>-Semences saines.</p> <p>- Rotation de 5 ans entre deux légumineuses.</p> <p>-Traitement de semences : il assure une protection efficace durant six semaines environ.</p> <p>-A partir du stade floraison : un à deux traitements fongicides.</p>
<p>Botrytis ou Pourriture grise</p> <ul style="list-style-type: none"> • (<i>Botrytis cinerea</i>) 	<p>- Une pourriture grise apparaît sous forme de taches sur les feuilles, les tiges et les gousses.</p>	<p>-Eviter les excès de végétation en limitant la fourniture d'azote par le sol (fumure organique).</p> <p>-Préférer les variétés à port léger et dressé.</p> <p>-Eviter des peuplements trop denses (semis de précision).</p> <p>-Soigner le désherbage.</p> <p>-Protection fongicide préventive dès la floraison en alternant les matières actives pour éviter l'apparition de souches résistantes.</p>

<p>Mildiou</p> <ul style="list-style-type: none"> • (<i>Peronospora pisi</i>) 	<p>-Les feuilles présentent alors des jaunissements sur la face supérieure et un duvet gris violacé sur la face inférieure. Sur gousses, les symptômes extérieurs sont peu perceptibles (taches vert clair sans sporulation). Par contre, à l'intérieur, un mycélium blanc est bien visible. A ce stade, les grains sont tachés ou absents.</p>	<p>-Rotation la plus longue possible entre deux cultures de pois (protéagineux et conserve). -Traitement de semences : en protégeant les pois jusqu'au stade 5 feuilles environ, il limite les infections primaires. -Utilisation de variétés peu sensibles. -Protection fongicide préventive en végétation, au stade 7-8 nœuds du pois (= 5-6 feuilles).</p>
<p>Oïdium du pois</p> <ul style="list-style-type: none"> • (<i>Erysiphe polygoni f.sp. Pisi</i>) 	<p>-De petites taches blanches et poudreuses qui colonisent d'abord les feuilles âgées. Un mycélium blanc et pulvérulent se développe ensuite sur tous les organes aériens.</p>	<p>-La résistance variétale existe. Elle est surtout développée sur les petit pois. -La lutte fongicide peut être préventive sur les variétés sensibles, ou menée de façon curative (dès les premiers symptômes) avec du soufre. Les résultats sont généralement bons dans la mesure où il s'agit d'un mycélium superficiel.</p>
<p>Sclérotiniose</p> <ul style="list-style-type: none"> • (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>). 	<p>-Apparition des sclérotés qui sont des nodules noirs de quelques millimètres d'épaisseur constitués de mycélium très condensé. Très résistants, ils peuvent vivre dans et à la surface du sol pendant 5 à 10 ans.</p>	<p>-Inclure des céréales ou des graminées fourragères dans la rotation. -Eviter les précédentes légumineuses, tournesol et colza. -Préférer les variétés à port léger et dressé. -Réduire la densité de semis (semis de précision). -Soigner le désherbage. -Eviter tout excès de végétation : ne pas apporter de matière organique. -Protection fongicide préventive et performante à partir de la floraison. - lutte biologique dans la rotation avec un champignon parasite.</p>

VIII-2- Les ravageurs de petit pois

De nombreux insectes ravageurs attaquent les cultures de pois à différents stades (**Chaux et Foury, 1994**).

- **Le thrips du pois :** (*Frankliniella robusta*) minuscule insecte piqueur (1 mm de taille) qui attaque les fleurs et les gousses et dont la larve se développe sur les gousses. Elle provoque un dessèchement et un rabougrissement de la plante.
- **La sitone du pois :** (*Sitona lineatus*) est un petit coléoptère qui dévore le limbe des feuilles en faisant des encoches semi circulaires sur le bord et dont la larve ronge les racines et les nodosités affaiblissant ainsi les plantes.
- **La cécidomyie du pois :** (*Contrinia pisi*) est un diptère qui provoque la formation des galles dans les fleurs.
- **Le puceron vert du pois :** (*Acyrtosiphon pisum*) pique les feuilles et les stipules et peut causer des dégâts en cas de pullulation. Il est aussi le vecteur de diverses maladies virales.
- **La tordeuse du pois :** se manifeste par sa chenille jaunâtre à tête noire d'environ 15 mm et qui vit dans les graines et peut en dévorer plusieurs successivement. Cet insecte ne peut accomplir son cycle complet que dans les cultures de pois secs.
- **Le bruche du pois :** (*Bruchus pisorum*) est un petit coléoptère qui pond dans les gousses en formation et dont les adultes se développent dans les grains mûrs et secs, ce ravageur n'est pas spécifique du pois. Contrairement au bruche du haricot, il ne se reproduit pas dans les grains entreposés. Il existe aussi le bruche tropical du pois (*Zabrotes subfasciatus* Boh) originaire d'Amérique du sud qui se reproduit dans les grains secs de plusieurs espèces de légumineuses (**Coutin ,2004**).
- **Autres ravageurs :** Les pois sont susceptibles d'être attaqués par les chenilles défoliatrices de plusieurs espèces de noctuelles :
 - La noctuelle du pois (*Melanchra pisi* L.)
 - La noctuelle potagère (*Lacanobia oleracea* L.)
 - La noctuelle gamma (*Autographa gamma* L.)
 - La noctuelle à point blanc (*Pseudaleta unipunctata* L.)

Des nématodes sont susceptibles d'attaquer le système racinaire tandis que des oiseaux, notamment les corbeaux freux et les pigeons ramiers, peuvent provoquer des dégâts sur les semis en déterrants graines et jeunes plantules mais aussi en pillant les gousses arrivant à maturité (**Jarso et al., 2006**).

Chapitre 02

*L'agent pathogène et techniques
d'isolement et d'identification*

Partie 1 : L'agent pathogène (*Ascochyta pisi* Lib.)

I- Définition d'*Ascochyta pisi* Lib.

Ascochyta pisi Lib. c'est l'agent causal de l'antracnose de petit pois (**Figure 08**), il est présent dans divers pays ; en Australie, en Asie, en Europe, en Afrique de Nord en Amérique du sud (**Avila et al., 2004**). *A.pisi* Lib. est un pathogène primaire et les lésions sur les premières feuilles viennent de semences infectées (**Smith et al., 1988**). Il appartient aux Champignons Anamorphiques et au groupe des Coelomycètes (champignons à conidies groupées dans des pycnides). Les conidies d'*A.pisi* Lib. sont bicellulaires, allongées, droites ou légèrement courbées, à extrémités arrondies. Son développement est essentiellement favorisé par une grande densité de plantation et des conditions climatiques relativement chaudes et humides. Ce champignon s'attaque essentiellement aux plantes de pleine maturité, et rarement aux jeunes semis, très fragiles, qui meurent immédiatement (**Nasraoui, 2008**).



Figure 08: Anthracnose (*Ascochyta pisi* Lib.) sur les feuilles et les gousses de pois (*Pisum sativum* L.)
(Tipaz C, 2014).

II-Historique et taxonomie

Ascochyta pisi Lib. est l'espèce type du genre *Ascochyta*. L'état sexuel *Didymella* est généralement attribué à la classe des Dothidéomycètes (Ascomycota).

Didymella pinodes (Berk. & A. Bloxam) Franz Petrak. est le nom le plus taxonomiquement correct pour l'état sexuel des pinodes d'*Ascochyta*. Le nom le plus couramment utilisé par les phytopathologistes est le synonyme *Mycosphaerella pinodes* (Farr *et al.*, 2010). Dans les travaux de Chilvers et ses collaborateurs (2009), des isolats de *D. pinodes* regroupés avec *D. exigua* (Niessl) Sacc., l'espèce type de *Didymella* étaient éloignés de *Mycosphaerella punctiformis* (Pers.) Starbäck, l'espèce type de *Mycosphaerella*. Il apparaît que *Didymella* est une affectation générique plus correcte pour les pinodes « *Mycosphaerella* ». Le champignon *D. pinodes* a récemment été placé dans une nouvelle combinaison sous le nom de *Peyronellaea pinodes* (Berk. & A. Bloxam) (Aveskamp *et al.*, 2010).

Phomapinodella est la troisième espèce de ce complexe pathogène. Un état sexuel pour ce champignon serait très probablement dans les dothidéomycètes de classe, puisque l'analyse génétique moléculaire a regroupé des isolats représentatifs avec *D. pinodes* (Chilvers, 2009). Bien que l'état sexuel ait été observé, le téléomorphe putatif n'a pas été nommé (Bowen, 1997). L'état asexué a également un nouveau nom, *Peyronellaea pinodella* (L.K. Jones) (Aveskamp *et al.*, 2010).

III-Position systématique

La classification taxonomique de l'agent pathogène *Ascochyta pisi* Lib. est la suivante :

<u>Division</u>	Eumycota
<u>Subdivision</u>	Deuterocota
<u>Classe</u>	Ceolomycetes
<u>Ordre</u>	Sphaeropsidales
<u>Famille</u>	Psidaceae
<u>Genre</u>	<i>Ascochyta</i>
<u>Espèces</u>	<i>Ascochyta pisi</i> Lib.

IV- Description morphologique

IV-1- Caractères macroscopiques

Il est évidemment possible de déterminer à l'œil nu l'aspect du champignon phytopathogène à partir des graines de petit pois contaminées sur milieu PDA avec une incubation pendant 7 jours à 20°C à l'obscurité.

Après l'incubation, les colonies d'*A. pisi* Lib. (**Figure 09**) mesurent environ 20-30 mm de diamètre ; ce diamètre diffère selon les souches (il peut être plus grand ou parfois plus petit), le mycélium est blanc, fin, érigé, et recouvre les graines contaminées sur la face inférieure, les colonies apparaissent d'une couleur marron orangé au centre et qui devient plus claire vers la périphérie des colonies. Les colonies sont parsemées de nombreux pycnides orangés.

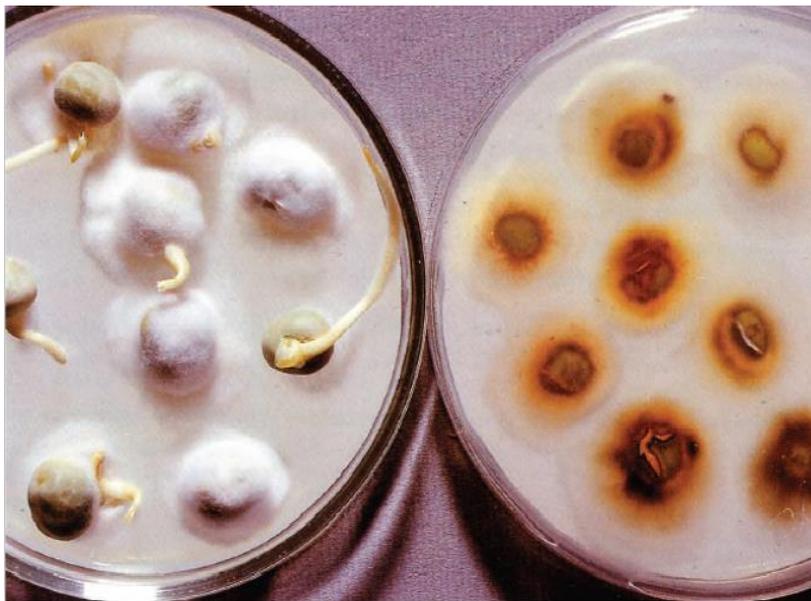


Figure 09 : Colonies d'*A pisi* Lib. face supérieure (à gauche) et face inférieure (à droite)
(ISTA, 2008).

IV-2 Caractères microscopiques

- **La forme imparfaite** du champignon est caractérisée par la production des corps fruitiers (pycnides) qui produisent des spores (**Figure 10**). Elles sont épiphyllées de couleur jaune marron, brun pale à marron foncé, de forme sphérique, rarement lenticulaire, leur diamètre est de 100-250 µm, munies d'un ostiole circulaire, mesurant

de 20 à 30 mm de diamètre, renforcées dans le tissu foliaire, répartis sur toute la zone infectée ou encore reliés les uns aux autres (Mel'nik *et al.*, 2000).

- **La forme parfaite** d'*Aschochyta pisi* Lib. (*Didymella pisi*) est caractérisée par des pseudothécies qui sont de forme ronde à irrégulière. De 200- 400 µm de diamètres, de couleur brun à noirâtre, avec un ostiole peu visible .Les asques sont bituniqués, cylindriques et contiennent linéairement 8 ascospores, mesurant 46-168 et 10-15mm. Les ascospores sont hyalines, diverses en 2 cellules inégales, rétrécies au niveau du septum, arrondies aux deux extrémités ou avec extrémité plus aigu. Mesurant 12-17,5 et 6,5-8,5 mm (Chilvers *et al.*, 2009).

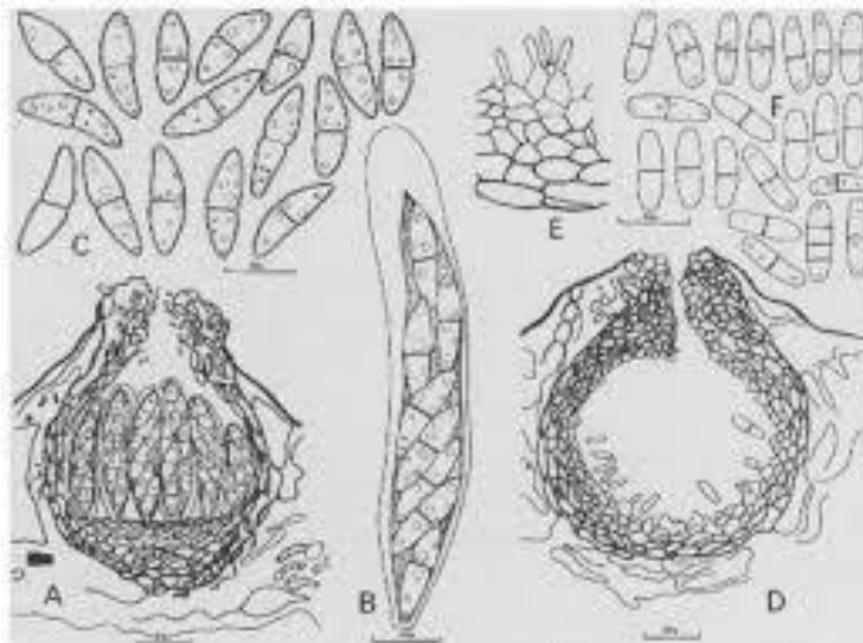


Figure 10 : Morphologie des organes de reproduction sexuée et asexuée chez *Aschochyta pisi* Lib.

(Punithalingham et Holiday, 1972).

A. Pseudothécies contenant des asques.

B. Asques (sacs) contenant des ascospores.

C. Ascospores.

D. Pycnidium.

E. Conidiophore sur substrat.

F. Les conidies (spores secondaires) sont produites sur les feuilles.

V- Symptomologie

L'antracnose du petit pois du printemps est une maladie causée essentiellement par le champignon parasite *Ascochyta pisi* Lib. qui peut affecter tous les organes en progressant du bas vers le haut de la plante. Elle se caractérise par des nécroses non coalescentes, d'abord translucides, puis brun clair en leur centre et entourées par une zone diffuse brun foncé à noire. On observe sur le petit pois des tâches jaune-beiges arrondies sur les feuilles, allongées sur les tiges et arrondies creuses sur les gousses. Elles sont entourées d'une marge brun foncé, d'un aspect parcheminé. Des pycnides glabres, facilement repérables, se groupent au centre des macules (**Punithalingam et Holliday, 1972**). Lorsque l'attaque du champignon est majeure, les tâches deviennent souvent confluentes. On peut notamment apercevoir sur les zones végétatives atteintes de petits points noirs, correspondant aux conidiophores.

V-1- Sur les feuilles

L'apparition des tâches jaune beige arrondies sur les feuilles.



Figure 11 : Symptômes d'*Ascochyta pisi* Lib. sur les feuilles de petit pois (**Anna, 2010**)

V-2- Sur les tiges

Des tâches allongées sur les tiges. Ils sont cependant beaucoup plus nuisibles, puisqu'ils peuvent entraîner un point de cassure au niveau de la tige.



Figure 12 : Symptômes d'*Ascochyta pisi* Lib. sur la tige de petit pois (Alamy, 2013)

V-3- Sur les gousses

Sur les gousses, on voit des macules rougeâtres arrondies creuses qui se nécrosent au centre. On assiste souvent à des défoliations apicales précoces.



Figure 13 : Symptômes d'*Ascochyta pisi* Lib. sur les gousses de petit pois (Alamy, 2013).

VI- Écologie de l'antracnose (*Ascochyta pisi* Lib.)

L'infection des plantes survient à une température de 4 °C et avec une humidité de 90%. Le développement élevé de la maladie est observé avec des précipitations abondantes et des températures de 20 à 25 °C. La période d'incubation peut varier de 2 à 4 jours selon la température et l'espèce de la maladie. En alternance entre temps humide et sec, le développement de la maladie ralentit et s'arrête complètement à des températures supérieures à 35 °C. L'incidence de la maladie causée par *A. pisi* Lib. dépend davantage de la quantité de pluie et l'humidité 78-86% est suffisante pour le développement de la maladie *A. pinodes* (Agro Atlas, 2009).

VII-Cycle de la maladie

Les champignons qui causent la brûlure aschocytique peuvent être transmis par les graines, par le sol ou survivre dans les déchets de pois. La maladie s'établit généralement lorsque les ascospores sexuelles du champignon (*D.pinodella*), produites dans les périthèces sur de vieux chaumes de pois, sont transportées dans la nouvelle culture par la pluie et le vent, provoquant une infection précoce. Les conidies asexuées sont produites par d'autres agents pathogènes des pycnides (organes de fructification) et peuvent infecter les plants de pois à n'importe quel stade de leur croissance. Les pycnides et les périthèces se développent sur les plantes infectées au long de la saison de croissance et après la récolte sur les chaumes de pois et les plantes volontaires infectées. Les ascospores sont la principale source d'infection primaire, tandis que l'infection secondaire est causée par la production de conidies (**Figure 14**).

Le rejet des deux types de spores nécessite de la pluie ou de la rosée, c'est pourquoi les épidémies sont plus graves dans des conditions plus humides. Les spores produites sur le feuillage infecté sont transférées sur les plantes saines adjacentes par le vent et les éclaboussures de pluie. La maladie peut également s'établir en semant des graines infectées, ce qui est une préoccupation majeure et jusqu'à 90 % des échantillons peuvent être infectés.

La proportion de plants malades provenant de tout lot de semences infecté est influencée par les conditions saisonnières telles que les fortes précipitations et les facteurs du sol. Au cours d'une année sèche, la plantation de semences infectées peut ne pas produire une culture malade, mais dans des conditions humides, une maladie grave est probable.

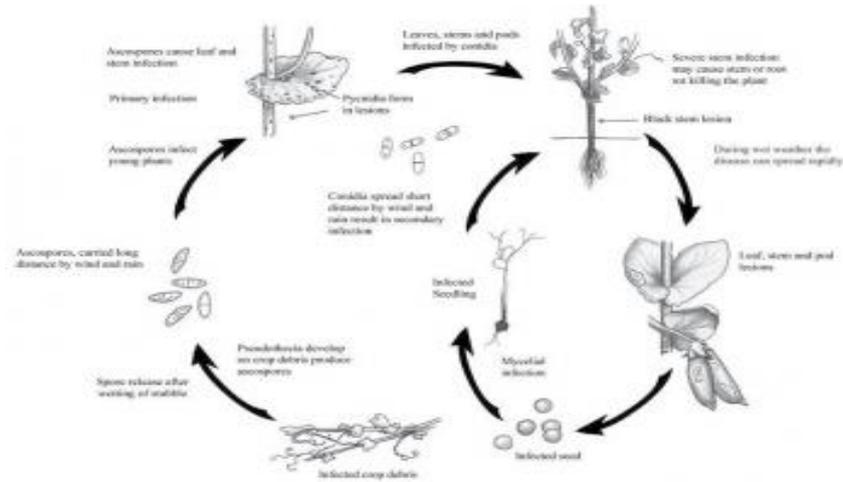


Figure 14 : Cycle de la maladie de l'*Ascochyta pisi* Lib. des petits pois de grande culture (Kylie Fowler, 2020)

VIII- Mécanisme d'infection

Ascochyta pisi Lib. un champignon pathogène nécrotrophe qui survit entre les saisons à travers les semences infectés (Morkunas *et al.*, 2012). Ce parasite pénètre normalement la plante de pois à travers la cuticule de feuillet.

Environ 24 à 48h après le contact des pyciospores avec la surface de limbe, un hyphes pénétrante issue d'un appressorium franchit la cuticule, généralement à la jonction de deux cellules épidermiques (il est probable que des cutinases sécrétées par le parasite participent l'épiderme entre deux cellules. La ramification du thalle dans les méats s'accompagne d'un collapsus des tissus superficiels. Le diamètre de la macule foliaire est en rapport avec l'importance du thalle sous cuticulaire (Bouzand, 1989)

A son début, la colonisation du parenchyme est principalement intracellulaire. Les cellules ne brunissent pas, mais se vacuolisent et dégénèrent, souvent à quelques distance des hyphes. Le parenchyme perd sa cohésion en raison de modification au niveau des lamelles moyennes pectiques, le cytoplasme devient hétérogène, et le plasmalemme se dégrade (Heath et Wood, 1969).

L'invasion di limbe s'exprime. Entre 5^{ème} et 8^{ème} jour, par des infiltrations lenticulaires et opaques. chaque lésion brun clair atteint au bout de 8^{ème} jour un diamètre de 2mm (extension maximale entre 0.25et 0.48mm/j) .L'abrasion des sites cuticulaires réduit la période d'incubation .Les tissus situés à l'extérieur de la marge brune ni lignifiée ni subérifié, sont réfractaires à l'implantation secondaires (Allard *et al.*, 1993).

Partie 2 : Techniques d'isolement et d'identification

I- Objectif

L'objectif de cette étude est de savoir comment isoler et identifier l'espèce *Ascochyta pisi* Lib. agent causal de l'antracnose à partir d'une culture des petits pois (*Pisum sativum* L.), qui servent de plante hôte.

II- Les milieux de cultures

Les milieux de culture utilisés dans les processus d'isolement et de purification sont :

1. Le milieu Mathur

Est un milieu semi synthétique nécessaire pour un bon développement de l'agent pathogène, et assure une meilleure sporulation (Bouznad ,1989).

2. Le milieu PDA (Pomme de terre Dextrose Agar)

Est un milieu à base d'extrait organique, il assure un bon développement mycélien de souches fongiques, il est utilisé notamment pour l'isolement et la purification des souches.

3. Le milieu CzapekDox Agar

Est un milieu minéral contenant du nitrate de sodium comme seule source d'azote utilisée pour la culture des champignons qui sont capables d'utiliser le nitrate de sodium comme seule source d'azote (clinisciences.com).

La composition des milieux précédents est décrite dans l'Annexe 01.

- **Mode opératoire :**

- Ces milieux de culture pour qu'ils donnent de meilleurs résultats de la croissance mycélienne, sont généralement ajustés avec de l'HCl jusqu'à pH= 5,5 et stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 30 min.
- Ainsi les milieux sont prêt pour l'ensemencement des isolats (à partir des feuilles, gousses, tige).

• **Lecture :**

Tableau 06 : Effet des milieux de culture sur la croissance mycélienne.

Les milieux	La croissance mycélienne	L'aspect cultural
PDA	- Production abondante du mycélium. - Croissance maximale	- Mycélium blanc aérien, fin et érigé de taille : 8,25 - 8,4cm - Colonies marron.
Mathur	- Production moins abondante d'un mycélium aérien.	- Mycélium de taille : 7,4-8,36 cm - Colonies de texture rasante et couleur rosâtre à saumon.
Czapek		- Mycélium de taille : 7,4-8,36 cm - Colonies blanchâtre.

III- Isolement

L'isolement s'effectue à partir du matériel végétatif infecté de la plante (les feuilles, les tiges et les gousses) par la méthode décrite par **Grewal et Jhooty (1984)** :

- Rinçage des plantes à l'eau du robinet afin de les débarrasser de leurs débris de terre.
- Après lavage, vient l'opération de découpage en fragments de 5 mm à 1 cm sur les fronts d'attaques (les parties présentant des tâches nécrotiques) puis la désinfection superficielle par trempage dans une solution diluée de l'eau de javel à 2% pendant 3 à 5 mn, ensuite, rinçage à l'eau distillée stérile 3 fois successives pendant 3 mn puis séchage entre 2 feuilles de papier filtre stérile.
- Après séchage, dépôt de 3 ou 5 fragments dans des boîtes de pétri contenant le milieu de culture gélosé et leur mise en incubation à 22 °C pendant 14 jour, sous

une photopériode de 12 h. Dès l'apparition des filaments mycéliens autour des petits fragments, l'observation microscopique est effectuée.

L'évaluation de la croissance mycélienne est mesurée quotidiennement pendant 14 jours.

- **Lecture :**

L'isolement à partir des gousses de *Pisum sativum* L. présentant des nécroses, révèlent un développement des souches fongiques aux extrémités des fragments comme la **Figure 15** le montre.

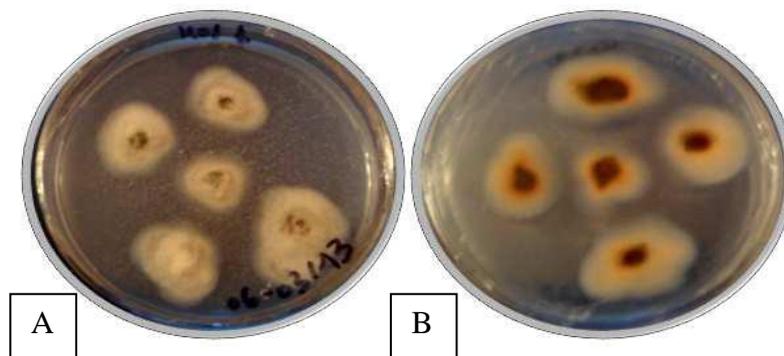


Figure 15 : Isolement du champignon *A.pisi* à partir des gousses (A : recto, B : verso).

IV- Purification

- Après incubation, des repiquages sont effectués de manière aseptique
- le prélèvement se fait au niveau de la zone périphérique des colonies à partir des cultures qui ne présentent aucune contamination ;
- Renouvellement de l'opération jusqu'à obtention d'une culture pure ;
- Après incubation, des observations microscopiques sont effectuées ;
- Les isolats qui présentent les caractères d'*Ascochyta pisi* Lib. sont cultivés sur milieu Mathur (**Annexe 01**) afin de favoriser la pycniogénèse (**Champion, 1997**).
- Pour limiter les risques de variabilité des isolats, il faut réaliser des cultures monospores.

- **Culture monospore**

La culture monospore s'effectue par deux techniques, soit à partir d'un apex d'un mycélium jeune quand la souche ne sporule pas, soit en prélevant une spore (**Rapilly, 1968**).

L'objectif principal de la culture monospore est d'obtenir un matériel fongique génétiquement homogène.

La réalisation de la culture monospore consiste à :

- Premièrement, repiquage de la souche à monospore dans une boîte contenant du milieu PDA et la laisser se développer sur la surface de la boîte pendant 5 à 6 jours.
- Ensuite, Prélèvement d'un explant à partir de la périphérie de la boîte pour l'introduire dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile, après agitation, on obtient une suspension sporale.
- A partir de cette dernière, des dilutions au 1/10 sont effectuées comme suit :
- Prélèvement d'1 ml de la suspension sporale que l'on introduit dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile puis agitation.
- Répétition de l'opération autant de fois jusqu'à la dilution voulue.
- A partir des deux dernières dilutions (10^{-3} et 10^{-4}), prélèvement d'1 ml qui sera étalé sur le milieu Agar 2% (**Annexe 01**). Après l'incubation à l'obscurité à 20° C, sous une loupe binoculaire, les germinations issues d'une seule spore unique sont repiqués sur une autre boîte de Pétri contenant le milieu PDA (**Henni et al., 1994**).

V- Identification

1. L'étude macroscopique

Ce type de caractérisation est basé essentiellement, sur l'aspect cultural de la croissance des isolats sur des milieux artificiels. Pour la distinction entre les isolats d'*Ascochyta*, il est envisagé de se baser sur les critères suivants :

- La pigmentation ;
- L'aspect du mycélium ;
- La vitesse de croissance ;
- L'abondance des pycnides.

- **Lecture :**

Les caractéristiques macroscopiques sont :

- Un mycélium aérien, fin, érigé et court,
- Colonies blanches avec un contour régulier
- Le revers des colonies est de couleur marron-orangé au centre de la boîte, et qui s'éclaircit vers la périphérie.

2. L'étude microscopique

Pour réaliser cette étude il faut suivre les étapes suivantes :

- Préparation d'un frottis à partir d'un fragment mycélien âgé de 15 jours.
- Observation microscopique des pycnides et des pycnidiospores.

- **Lecture :**

L'observation microscopique des isolats d'*Ascochyta pisi* Lib. par la culture sur milieu PDA montre :

- Présence de pycnides et de pycnidiospores (stade imparfait); les pycnides apparaissent d'une couleur jaune à marron, de forme sphérique enfoncées dans le tissu foliaire (**figure 16 - 1**). Les pycnidiospores sont hyalines, cylindrique, avec les deux extrémités arrondies et présence d'un ou deux cloisons (**figure 16 - 2**).

- Le mycélium est cloisonné (**figure 16 - 3**).

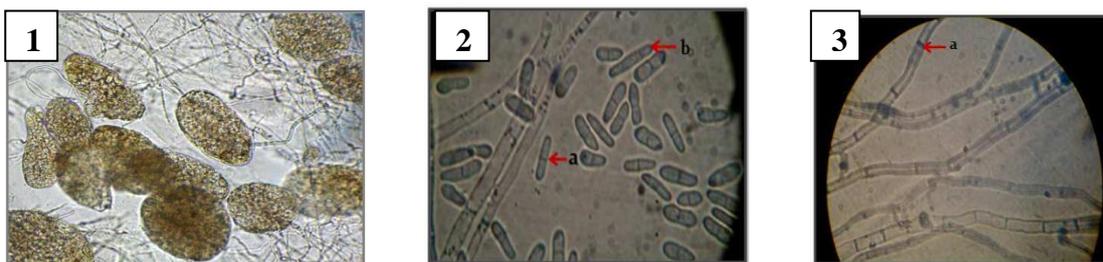


Figure 16 : *Ascochyta pisi* Lib. sous microscope optique.

1- Pycnides observées sur milieu PDA au microscope optique (x 100)

2- Pycnidiospores observées sous microscope optique (x400).

(a) : Pycnidiospore avec une seule cloison, (b) : Pycnidiospore avec deux cloisons.

3- Mycélium cloisonné observé sous microscope optique (x400) (a) : Cloison.

VI- Conservation des isolats

Les souches fongiques purifiées sontensemencées sur milieu gélosé incliné pour une conservation de courte durée (milieu PDA+30 mg d'antibiotique de spectre large d'activité contre les bactéries a Gram – et +), puis incubées à 30°C jusqu' à sporulation. Ensuite conservées au réfrigérateur à 4°C.

Dans le cas de présence des spores, on les récolte et on les conserve dans de l'eau physiologique stérile qui est une solution isotonique pour une meilleure conservation de longue durée.

Chapitre 03

Les moyens de lutte

I-Lutte culturale

Il y a plusieurs techniques générales pour prévenir l'ascochytose ou l'antracnose du petit pois :

- Faire pousser les pois en région sèche.
- Utiliser des semences saines puisque les semences contaminées constituent la source principale d'infestation de la maladie cryptogamique.
- Arracher et éliminer les plantes malades pour limiter la contamination.
- En période humide, pluvieuse, éviter de passer entre les rangs de pois pour ne pas provoquer la dissémination de la maladie.
- Eviter de mouiller le feuillage lors des arrosages.
- Procéder à une rotation des cultures sur quatre ans minimum sans plante hôte puisque l'agent pathogène *A.pisi* Lib. peut se conserver si les petit pois sont cultivés plusieurs fois sur la même parcelle.
- Enterrer ou enlever les débris végétaux et restes de culture (**Koppert, 2020**).

Il y a aussi d'autre méthodes et techniques plus précises pour lutter contre cette maladie :

II- Lutte biologique

La lutte biologique exploite les mécanismes de régulation naturelle des populations. Cette régulation est le résultat d'une balance entre potentiel biotique des organismes vivants et la résistance opposée à leur développement par leur environnement. Facteurs biotiques et abiotiques se conjuguent en effet pour empêcher le développement démesuré de leurs populations. Il est cependant admis que ces facteurs naturels de régulation sont généralement insuffisants pour faire face aux situations d'épidémies. Ainsi l'intervention de l'homme s'avère nécessaire pour leur donner l'ampleur voulue.

L'utilisation des antagonistes, tel que le genre *Trichoderma* qui montre une polyvalence et une grande souplesse d'adaptation souvent cité hors de son biotope d'élection. Il conserve des propriétés étonnantes en traitement des organes aériens des plantes, réalisant ainsi d'efficacité avec les fongicides (**Ponchet, 1993**).

Le genre *Trichoderma* a la capacité de produire des enzymes, des substances bioactives, et son développement rapide font de ce genre un agent potentiel en agroalimentaire et une matière de choix pour l'exploitation industrielle (Prieto *et al.*, 1997).

Quelques espèces de ce genre ont un intérêt économique, pour leur production d'enzymes cellulolytiques et sont utilisés comme agents de lutte biologique en raison de leur antagonisme vis-à-vis d'autres espèces fongiques.

Les colonies de l'espèce *Trichoderma harzianum*, sont floconneuses ou bien compactées en touffes. La coloration des colonies dépend de la pigmentation des phialides généralement donne une couleur verte, et le revers est généralement incolore (Figure 17 - A).

Sur le plan microscopique (Figure 17 - B), le mycélium est composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores sont forme conique ou pyramidale, ils sont ramifiés et portent des phialides en forme de flasque ou de quilles. A leurs tour, les phialides portent des spores (phialospores ou bien conidies) (Kubicek *et al.*, 2003).

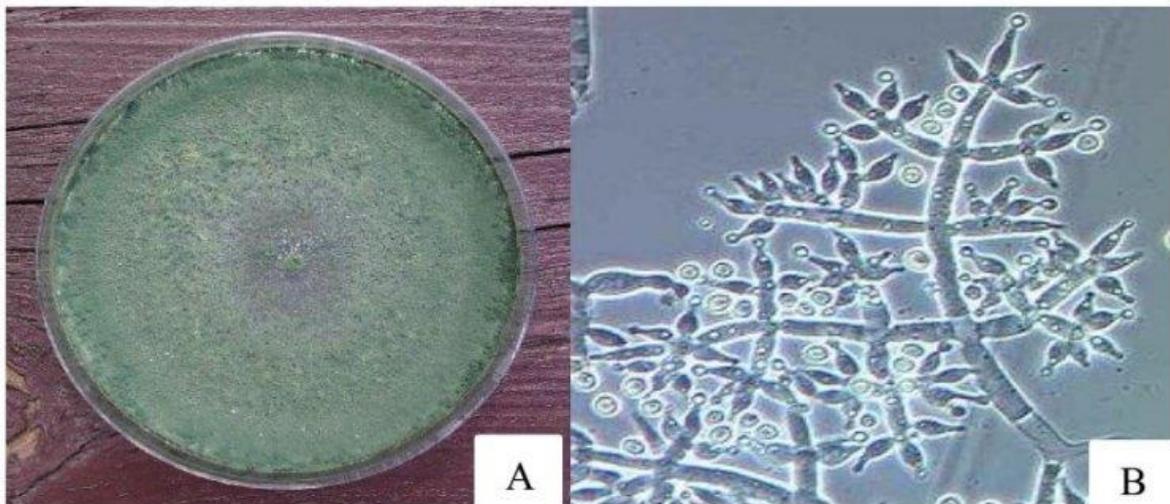


Figure 17: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de *Trichoderma harzianum*.

II-1 Mode d'action de Trichoderma

L'antagonisme des *Trichoderma* se fait par 4 modes d'action récapitulés dans le **Tableau 07**.

Tableau 07 : Modes d'action et mécanismes d'antagonisme

Modes d'action	Mécanismes
Antibiose	<p>Les <i>Trichoderma</i> émettent des substances qui peuvent inhiber d'autres microorganismes et qui sont de deux types :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Substances non volatiles (Annexe 02) - Substances volatiles ou gazeuses (Annexe 02)
Action par mycoparasitisme	<p>L'antagoniste attaque le pathogène en perçant les hyphes et en les envahissant, il s'attache à son hôte en enroulant ses hyphes autour de celles de l'hôte. Il peut se fixer aussi par des crochets. Après contact, il secrète des enzymes de type B (1-3) glucanase. Le mycoparasite pénètre alors dans les cellules de l'hôte et y consomme le contenu cytoplasmique (Maslouhy, 1989).</p>
Action par compétition	<p>La compétition s'exerce pour un site ou pour un substrat nutritif, ce mécanisme fonctionne dans le cas de la protection des grappes de raisin contre la pourriture grise (Dubos et al., 1983).</p> <p>Les substances nutritives se trouvent en générale en quantité limitée et souvent les micro-organismes entrent en compétition pour les procurer.</p>
Action par élancements	<p>D'après Molot (1983) les filtrats de culture de <i>Trichoderma</i> contient des substances électriques d'une résistance au pathogène dans les feuilles des végétaux.</p> <p>En règle générale, les mécanismes antiparasitaires varient non seulement selon les protagonistes présents mais également selon les fonctions de milieu.</p>

II-2 Activité antagoniste de *Trichoderma harzianum* vis-à-vis d'*Ascochyta pisi* Lib.

Une confrontation directe (antibiose) in vitro selon la méthode de Patel et Brown (1969) se réalise comme suit :

Dans des boîtes de Pétri contenant 15 ml de milieu PDA, deux disques gélosés (6 mm de diamètre), l'une portant l'agent pathogène (*Ascochyta pisi* Lib.) et l'autre la souche à tester (*Trichoderma harzianum*), sont placées suivant un axe diamétral à 4,5 cm de distance et à équidistance du centre de la boîte (**Figure 18**).

Pour les témoins, le dépôt d'un disque mycélien du pathogène dans la boîte (**Figure 19**).

L'essai est réalisé avec 2 boîtes mises en incubation à l'obscurité pendant 5 jours à $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

La croissance mycélienne d'*Ascochyta pisi* Lib. est évaluée tous les jours en mesurant le rayon du parasite du côté de l'antagoniste ainsi que sa vitesse de croissance (mm/j). Cette évaluation est faite toutes les 24 heures pendant 4 jours.

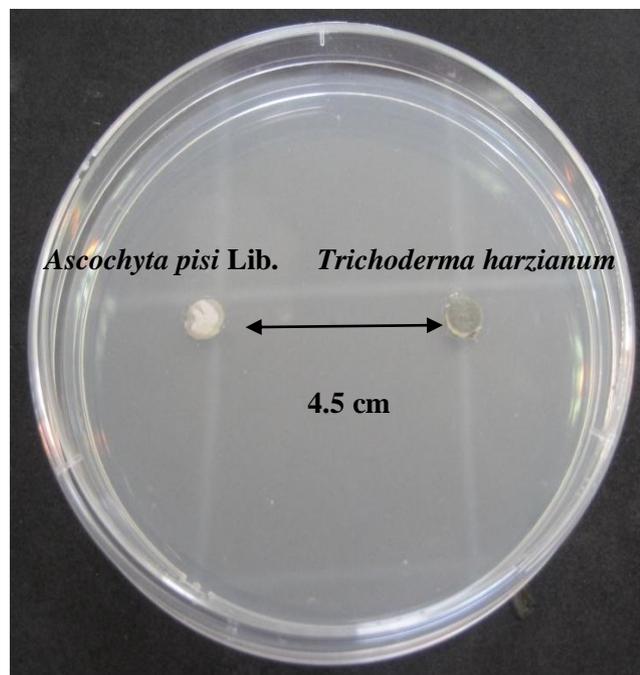


Figure 18 : Confrontation directe entre *Ascochyta pisi* Lib. et *Trichoderma harzianum* sur milieu PDA (Wikipédia).

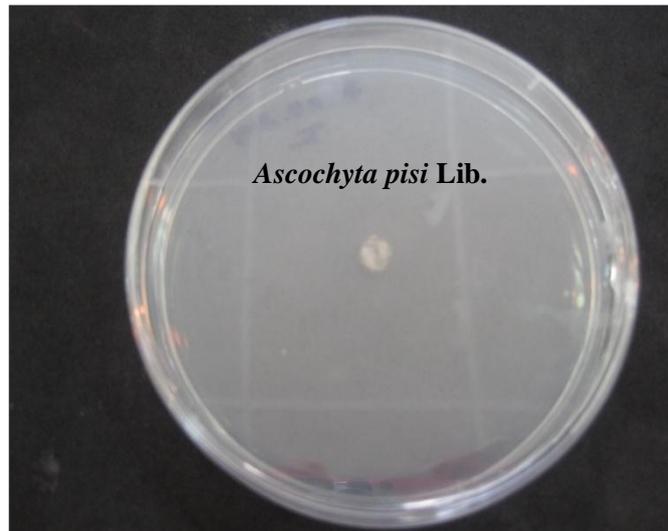


Figure 19 : Test de confrontation directe pour le témoin sur milieu PDA (Wikipédia).

- **Lecture :**

En s'appuyant sur des études précédentes, la confrontation de *Trichoderma harzianum* avec *Ascochyta pisi* Lib., démontre que :

- En présence de *Trichoderma harzianum* une réduction importante puis un arrêt de la croissance mycélienne des colonies d'*Ascochyta pisi* Lib. par rapport au témoin.
- La croissance de *Trichoderma harzianum* est beaucoup plus rapide que celle d'*Ascochyta pisi* Lib. dès que les deux champignons sont mis en confrontation.
- La croissance mycélienne d'*Ascochyta pisi* Lib. confrontée par *Trichoderma harzianum* est influencée. A partir du 2^{ème} jour cette influence est observée avec la formation de zone d'inhibition, la croissance mycélienne de l'agent pathogène étant fortement inhibée par la croissance et le développement de *Trichoderma harzianum* au 4^{ème} jour.
- Les études statistiques ont révélés que *Trichoderma harzianum* possède une forte action inhibitrice sur la vitesse de la croissance mycélienne de l'agent pathogène *Ascochyta pisi* Lib.
- Quand le taux d'inhibition augmente, la vitesse de la croissance diminue et inversement.

- L'étude de la sporulation des colonies d'*A.pisi* Lib. montre une réduction significative importante de la sporulation par rapport au témoin.
- L'action inhibitrice de *Trichoderma harzianum* est due à des composés de nature chimique (antibiotiques, mycotoxines ...) libérés par les souches de *Trichoderma* et qui jouent un rôle important dans l'activité antagoniste des espèces.

III- Lutte chimique

La lutte chimique contre les agents phytopathogènes concerne essentiellement les champignons responsables des maladies fongiques des plantes. La plupart des fongicides affectent directement des fonctions essentielles, comme par exemple la respiration, la biosynthèse des stérols ou la division cellulaire.

Il existe plusieurs familles des fongicides dont chacune a une cible précise (**Tableau 08**).

Tableau 08 : Les principales familles des fongicides utilisées (Legrève, 2016).

La famille de fongicide	La cible
Les Morpholines (Tridémorphe, Fenpropimorphe)	agissent principalement sur l'oïdium.
Les Triazoles (Epoxyconazole, Fluquinconazole, etc.)	agissent sur beaucoup de maladies en détruisant les membranes des cellules des champignons.
Les Strobilurines (Azoxystrobine, Krésoxim-méthyl, etc.)	stoppent l'activité des mitochondries et donc la respiration des cellules.
Les Carbamates (Carbendazime, Manèbe)	agissent sur le noyau des cellules des champignons.
Les Pyrimidinamines (Cyprodinil)	agissent sur le piétin-verse et l'oïdium.

Attention à ne pas laisser « démarrer » la maladie. En effet, les traitements fongicides deviennent alors pratiquement inefficaces.

III-1 Les fongicides utilisés

1. Le penconazole

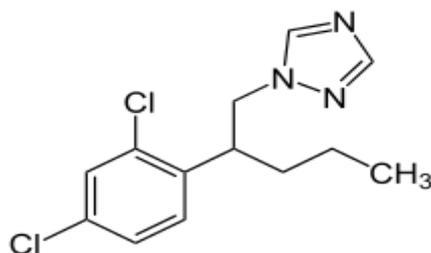


Figure 20 : Structure de penconazole (Wikipédia).

De la famille chimique des triazoles. Il se présente sous forme de cristaux blancs à l'état pur. Il est soluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques.

Absorbé par les feuilles et les organes herbacés des végétaux, il est doté de propriétés systémiques. Actif à l'égard de nombreux champignons et particulièrement efficace sur les oïdiums de nombreuses plantes cultivées. Intéressant en usage préventif, il montre également certaines propriétés curatives et un effet éradiquant sur certains champignons (*Venturia inaequalis*).

Il est commercialisé sous le nom de Topaze syngenta Agro (Acta, 2006).

2. Le difénoconazole

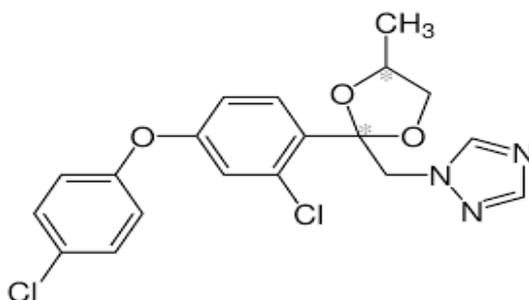


Figure 21 : Structure de difénoconazole (Wikipédia).

De la famille chimique des triazoles, il se présente sous forme de poudre cristalline blanche à l'état pur. Sa solubilité dans l'eau à 3.3 mg/l à 20°C, comme il est très soluble dans la plupart des solvants organiques.

Absorbé par les feuilles et les organes herbacés des végétaux, il agit sur les champignons phytopathogènes pendant leur pénétration dans l'hôte, Il a aussi un effet curatif et même éradiquant dans certains cas.

Commercialisé sous le nom de Score Syngenta Agro (**Acta, 2006**).

La formule chimique et la masse molaire de chaque fongicide sont détaillées dans l'**Annexe 02**.

III-2 Mode d'action des fongicides

Les fongicides utilisés pour combattre les champignons pathogènes assurent l'inhibition de la croissance ou la mort de ces pathogènes.

Ils ont un mode d'action différent car il y a ceux qui interviennent :

- Avant l'infection pour prévenir la maladie.
- Pendant la phase d'incubation.
- Empêchent la sporulation.
- Eliminent le champignon et le tue.

III-3 Etude de l'action des fongicides sur la croissance mycélienne d'*Ascochyta pisi* Lib. in vitro

Selon la méthode de Patel et Brown (1969), on incorpore chaque fongicide : le penconazole et le difénoconazole dans le milieu de culture PDA maintenu en surfusion dans un bain marie à 50°C puis coulé à raison de 20 ml dans des boites de Pétri avec de différentes concentration de fongicide, 3 boites de Pétri sontensemencées avec des rondelles de 5 mm de diamètre issue de la marge d'une culture jeune de 7 jours. Ces boites sont incubées à 20°C et l'obscurité. Le témoin est réalisé dans les mêmes conditions sans fongicide (**Hassikou et al., 2003**).

La croissance mycélienne est estimée toutes les 48h en mesurant la moyenne de diamètre perpendiculaires les plus dissemblables de chaque colonie.

• **Lecture :**

Tableau 09 : Action des fongicides utilisés sur la croissance mycélienne d'*Ascochyta pisi* Lib. (Anses, 2014).

Le fongicide	Mode d'action sur <i>Ascochyta pisi</i> Lib.
Penconazole	<ul style="list-style-type: none"> - Fongitoxicité à des concentrations de 0.25ml/l et 0.5ml/l = inhibition totale.. - Agit sur les membranes en inhibant la biosynthèse des stérols.
Difénoconazole	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition totale la croissance mycélienne à partir des concentrations de 0.2ml/l. - Inhibe la synthèse des stérols et empêche la croissance des hyphes dans les tissus de la plante hôte.

IV- Lutte génétique :

Le principal objectif de la lutte génétique contre l'ascochyrose est de créer des variétés durablement résistantes à cette maladie. Cette lutte fait introduire des gènes de résistance au niveau des plantes qu'on appellera plante transgénique, ces gènes produisent des protéines susceptible pour éliminer le parasite (**Henni, 1998**).

Chez le petit pois, plusieurs sources de résistances sont connues et étudiées depuis des années mais elles n'ont pas encore permis l'obtention de cultivars totalement résistants à l'ascochyrose. Raison pour laquelle, la majorité des cultivars actuellement sur le marché demeurent sensibles et dans les meilleurs des cas munis de résistance partielle (**Nassir et Hoppe, 1991; Clulow et al., 1992 ; Cousin et al., 1993**). Le cultivar résistant doit être choisi en fonction de la race dominante. Aucune résistance génétique à *Mycosphaerella pinodes* n'est disponible chez les cultivars commercialisés (**Wange et al., 2000**).

Conclusion générale

Conclusion générale

Le petit pois est un aliment essentiel qui pousse sur de larges surfaces agricoles à travers le monde entier. Cette plante subit comme toutes les autres plantes des pathologies dues à divers agents pathogènes, parmi ces maladies, l'anthracnose causée par *l'Ascochyta pisi* Lib. qui peut affecter toutes les parties de la plante hôte et créer des dégâts qui influent, par conséquent sur l'économie et le rendement agricole.

Des fois, les mécanismes de défense naturelle de la plante sont insuffisants devant l'agressivité du pathogène, ce qui nécessite l'intervention de l'homme.

La lutte contre cette maladie nécessite en premier lieu l'isolement et l'identification de l'agent causal pour faire le bon choix des techniques qui contribuent à l'éradiquer.

Selon des études déjà faites dans ce sens, il est décelé que le milieu PDA donne une très bonne croissance mycélienne d'*Ascochyta pisi* Lib. agent de l'anthracnose de petit pois à une température de 20 °C. Tandis que le milieu Mathur reste un substrat important pour la sporulation de ce pathogène.

L'antagonisme entre *l'Ascochyta pisi* Lib. et le *Trichoderma harzianum*, comme moyen de lutte biologique, montre la capacité de ce dernier à inhiber la croissance mycélienne du pathogène *l'Ascochyta pisi* Lib. et à réduire la sporulation.

Pour la lutte chimique, les fongicides de la famille Triazole (Penconazole – Difenconazole) inhibe la croissance mycélienne d'*Ascochyta pisi* Lib. Le difenoconazole agit d'une manière très efficace sur *Ascochyta pisi* Lib. par une inhibition totale.

Parmi les techniques modernes de lutte contre les agents pathogènes figure la lutte génétique. Elle consiste à l'introduction de gènes de résistance au niveau de la plante qui lui confèrent la capacité de s'opposer à l'agent pathogène et l'éliminer, mais une résistance totale à l'anthracnose n'est pas encore disponible.

Annexes

Annexes

Annexe 01

➤ Milieu Mathur (g/l)

- Agar agar 20g
- Glucose : 2,80g
- Phosphate mono potassique : 1,73g
- Sulfate bactériologique : 1g
- Extrait de levure : 0,50g
- Eau distillée : 1L
- pH = 5,5

➤ Milieu PDA (g/l)

- Pomme de terre : 200g
- Glucose : 20g
- Agar agar : 20g
- Eau distillée : 1 L
- pH = 5,5

➤ Milieu Czapek Dox Agar (g/l)

- Phosphate mono potassique : 1g
- Nitrate de sodium : 2g
- Chlorure de potassium : 0,50g
- Sulfate ferreux : 0,1g
- Glucose : 20g
- Agar agar : 20g
- Eau distillée : 1L
- pH = 5,5

➤ Milieu Agar 2%

- Agar : 20g
- Eau distillée : 1L

Annexe 02

➤ Substances non volatiles

Windling et Emarson ont mis en évidence la présence de substances non volatiles, ils ont réussi à isoler également une substance toxique à partir de quelques souches de *Trichoderma virride* appelé en 1939 « Gliotoxine ». Ce sont Denis et Webster en 1971 qui ont confirmé la production d'autres antibiotiques solubles dans le chloroforme comme Trichodermatine et des péptides.

➤ Substances volatiles ou gazeuses

L'émission des substances volatiles est constaté par Denis et Webster en 1971, mais le doute subsiste sur la nature chimique des produits émis ; s'agit-il d'une substance précise (acétaldéhyde) selon ces chercheurs cités-ci-dessus ou d'un mélange complexe.

En effet, les travaux d'Oliver et Germin en 1983 nous permettent de savoir que le bon niveau de production de composés gazeux est obtenu quand le *Trichoderma* est cultivé sur un milieu cellulosique ; à partir de là, ces auteurs ont conclu que la production de ces substances varie en fonction du milieu de culture.

➤ Penconazole

- Formule chimique : $C_{13}H_{15}Cl_2N_3$
- Masse molaire : 284,2g/mol

➤ Difénoconazole :

- Formule chimique : $C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$
- Masse molaire : 406,26g/mol

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

1. **ACTA, 2006.** Index phytosanitaire 42^e édition.
2. **AgroAtlas, 2009.** Consulté le 14 avril 2014
http://www.agroatlas.ru/en/content/diseases/Fabacee/Fabacee_Ascochyta_pisi/.
3. **Agrobaf, 2019.** <https://www.agro.basf.fr>
4. **Alamy,2013** Alamy banque d'image – Nigel Cattlin 11 mars 2013
5. **Allard C, Bill, L., Touraud, G., 1993.** L'antracnose du pois : revue bibliographique de synthèse. *Agronomie* 13 : P 5-24.
6. **Anna L. snowdon, 2010.** A color atlas of harvest disease and disorders of fruits and vegetables Vol.2: Vegetable
7. **Anses, 2014.** L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail- maisons Alfort 23 Décembre 2014.
8. **Aveskamp, M. M., de Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Verkley, G. J. M., and Crous, P. W. 2010.** Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterize *Phoma* and related pleosporalean genera. *Stud. Mycol.* 65:1-60
9. **Avila, C.M., Satovic, Z., Sillero, J.C., Rubiales, D., Moreno, M.T.,Torres, A.M., 2004:** Isolate and organ-specific QTLs for ascochyta blight resistance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Theor. Appl. Genet.* 108, 1071–1078.
10. **Bouznad, Z., 1989.** Contribution à la connaissance du genre *Ascochyta* cas particulier de l'étude biologique, ultrastructurale et cytochimiques des réactions hôte parasite chez le couple *Pisum sativum* L./*Ascochyta pisi* Lib..These doctorat université pierre et Marie curie.Paris.P185.
11. **Brink, M et Belay, G. 2006 .**Resources végétales de l'Afrique tropicales 1.Céréales et légumes secs. Fondation PROTA. 328 p
12. **CA, 2018.** Le courrier d'Algérie 24 oct 2018 via le site internet <https://lecourrier-dalgerie.com/constantine-plus-de-6-000-hectares-reserves-aux-legumes-secs/>
13. **Calara Elisa Tipaz Cuaical ,2014.** Universidad Politécnica Estatal Del Carchi.
14. **Champion, R. 1997.** Identifier les champignons transmis par les semences: INR Paris. 401P.
15. **Chaux Cl. et Foury Cl., 1994.** Productions légumières, tome 3, légumineuses potagères, légumes fruits, chap. 2 Petit pois ou pois potager, Lavoisier Tec & Doc, coll. « Agriculture d'aujourd'hui », Paris.

16. **Chaux C and Foury C. 1994.** Productions légumières, tome 3, légumineuses potagères, légumes fruits, chapitre 2 Petit pois ou pois potager, Paris, Lavoisier Tec & Doc, coll. « Agriculture d'aujourd'hui ».563 p.
17. **Chilvers, MI., Rogers, JD., Dugan ,FM., Stewart, J., Chen, W., Peever ,TL.2009.** *Didymella pisi* sp. nov., the teleomorph of *Ascochyta pisi* .journal of Mycological research (Mycol Res) Vol. 113 Issue Pt 3 Pg. 391-400 (Mar 2009) ISSN: 0953-7562 [Print] England
18. **Ciqual .2017** – ANSES. Table de composition nutritionnelle des aliments – via le site internet www.anses.fr , consultée le 04/01/2017.
19. **Clulow, S.A., Lewis, B.G., and Matthews, P. 1992.** Expression of resistances to *Mycosphaerella pinodes* in *Pisum sativum*. Plant Pathology 41: 362-369.
20. **Cousin, R., Burghoffer, A., Marget, P., Vingere A. and Eteve, G. 1993.** Morphological, physiological and genetic bases of resistance in pea to cold and drought, In: Breeding for stress tolerance in cool-season food legumes, ICARDA. Eds K.B.Singh and M.C. Saxena, pp 311-320.
21. **Coutin R, 2004.** "les invertébrés vivant au dépens du pois" dans insectes.p19-22.
22. **DSASI. 2001.** Direction des Statistiques Agricoles et des Systèmes d'Information, Ministère de l'Agriculture, Série B (2001), 43 P.
23. **Dubos B., Roudet J., Bulit J. et Bugaret Y., 1983.** L'utilisation du *Īaichodeama hangianum* dans la pratique viticole, pour lutter contre la pourriture grise (*Botrytis cinerea*). Les antagonismes microbiens, 24ème colloque SFP, Bordeaux 26-28 Mai 1983, Ed. INRA (Les colloques de l'INRA NO. -1- 8 : 289-296.
24. **Elzebroek, T., and Wind, K. 2008.** Guide to cultivated plants. CAB International, Oxfordshire, UK. enzymology. New York: Academic Press. (1):149-158.
25. **FAO, 2009.** Food and alimentation organization. Sur le site FAO-STAT : [http\\apps.fao.org](http://apps.fao.org)
26. **FAOSTAT-dat2004.** <http://apps1.fao.org/faostat>.
27. **Farr, D. F., Rossman, A. Y., Palm, M. E., and McCray, E. B. 2010.** Fungal Databases. Online. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, USDA-ARS, Washinton, DC.
28. **Free J.B. 1993.** Insect pollination of crops. 2nd ed. Academic Press. London, 152 p.
29. **Gerbeaud, 2018** <https://www.gerbeaud.com/jardin/fiches/pois-semis-culture-recolte,1566.html>

30. **Grewal et Jhooty**, Grewal, RK et Jhooty, J.S., **1984**. Rating of gram Cicer arietinum blight in fungicidal trials. Crop. Improv_ 11(1): 71-72.
31. **Haskell, G. 1943**. Spatial isolation of seed crops. Nature (London) 152: 591-592.
32. **Hassikou R. ,2003**. « efficacité in vivo et in vitro de quelque fongicides sur *Curvularia lunata*. p 45,51.
33. **Heath, M., et Wood,R. 1969**. Leaf spots induced by *Ascochyta pisi* and *Mycosphaerella pinodes*. Annals of Botany 33: 657-670.
34. **Henni, J.E.1998**. Morphologie, pouvoir pathogène et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*. Doctorat d'état en science de la nature (phytopathologie), Université d'Oran.
35. **Ildis, 2001**. Legumes of the world. International Legume database and Information Services, The University of Reading.
36. **ISTA (International Seed Testing Association) .2008. Rule 7-005**: Detection of *Ascochyta pisi* Lib.on *Pisum sativum* (Pea).
37. **Jarso.M, Keneni. G,Messiaen.C-M, Seif .A.A, 2006**. "*Pisum sativum*. L" , fishier de protabase
38. **Koppert, 2020** <https://www.koppert.fr/defis/maitrise-des-maladies/ascochytose-du-pois-anthraxnose-du-pois/>
39. **Kubicek C. P., Bissett J., Druzhinina I., Kullnig-Gradinger C. et Szakacs G., 2003**. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma* sp.: a case study on South-East Asian isolates. Fungal Genet. Biol., 38 (3): 310-319.
40. **Kylie Fowler, 2020** field crop via le site internet extensionaus.com.au. 22/06/2020.
41. **Lambert, 2016** Cours de biologie végétale Licence 1 Mme Lambert 2015/2016.
42. **Legrève, 2016** Lutte biologique, protection intégrée et contrôle phytosanitaire.
43. **Loumont et chevassus A, 1960**. Note sur l'alimentation de lentille en Algérie ; ANN, INRA el Harrach, tome 2 pp 3-37.
44. **MADR, 2009**. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, Direction des statistiques.
45. **MADR, 2014**. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, Direction des statistiques.
46. **Maslouhy M. A. N., 1989**. Contribution à l'étude *in vitro* et *in situ* des antagonistes de *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis*, agent causal du bayoud. Thèse doctorat, Université Cadi Ayyad, Faculté des sciences, Marrakech, 98 p.

- 47. Mel'nik, V., Braun, V., and Hagedorn, G. 2000.** Key to the fungi of the genus *Ascochyta pisi* Lib. (Coelomycètes), édition: Mitt.Bio, 379 p.
- 48. Messiaen, C.M., Blanchaed, D., Rouxel, F. and Lafon R., 1991.** Les maladies des plantes maraîchères, INRA éditions, 3^{ème} édition, (ISBN 2-7380-0286-2), pp 291-305.
- 49. Messiaen, C.M. 2010.** Le potager familial méditerranéen. Edition Versailles, 191 p
- 50. Morkunas, I., Formela, M., Marczak, L., Stobiecki, M., and Bednarski, W. 2012.** The mobilization of defense mechanisms in the early stages of pea seed germination against *Ascochyta pisi* Department of Plant Physiology, Protoplasma 250:63–75
- 51. Nasir, M., et Hoppe, H.H. 1991.** Studies on pathotype differentiation within *Mycosphaerella pinodes* (Berk et Blox) vestergren, a component of the *Ascochyta* disease complex of pea (*Pisum sativum* L.). Journal of plant diseases and protection 98: 619-626.
- 52. Nasraoui Bouzid 2008.** Principales Maladies Fongiques des Céréales et des Légumineuses en Tunisie 104 p.
- 53. Plant Use, 2020** via le site internet
[https://uses.plantnetproject.org/fr/Pisum_sativum_\(PROTA\)](https://uses.plantnetproject.org/fr/Pisum_sativum_(PROTA)) Consulté le 1 mars 2020.
- 54. Ponchet J. 1993 :** Reconnaissance et domestication de l'antagonisme microbien. Les antagonismes microbiens, mode d'action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes. XXIV colloque de la société française de phytopathologie pp.16.
- 55. Pouvreau, A. 2004.** Les insectes pollinisateurs. Delachaux & Niestlé, 157 p.
- 56. Prieto A., Leal J. A., Poveda A., Jiménez-Barbero J., Gómez-Miranda B., Domenech J., Ahrazem O. et Bernabé M., 1997.** Structure of complex cell wall polysaccharides isolated from *Trichoderma* and *Hypocrea* species. Carbohydrate Research, 304 (3-4): 281-291.
- 57. Prieto et al., 1997** Prieto A., Leal J. A., Poveda A., Jiménez-Barbero J., Gómez-Miranda B., Domenech J., Ahrazem O. et Bernabé M., 1997. Structure of complex cell wall polysaccharides isolated from *Trichoderma* and *Hypocrea* species. Carbohydrate Research, 304 (3-4): 281-291.
- 58. Punithalingam, E., Holliday, P. 1972.** *Ascochyta pisi*, *Mycosphaerella pinodes*. In:

- Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. CMI Kew, Surrey, pp 334-340
- 59. Rapilly, F., 1968.** Les Technique de Mycologie en Pathologie Végétale. Annales des Epiphytes, vol. 19. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 102 pp.
- 60. Sante pratique, 2019** via le site internet www.santepratique.fr
- 61. Smith, I. M., Dunez, J., Lelliott, R. A., Phillips, D. H., Archer, S. A., 1988:**
European handbook of plant diseases. Blackwell Scientific Publications.
- 62. Stone, RE., 1912:** The life history of *Ascochyta* on some leguminous plants. Annals of Mycology 10: 564–592.
- 63. Terbeche et al., 2015** R. Terbeche, N.E. Karkachi, S. Gharbi, M. Kihal, J.E. Henni 2015. Isolation and physicochemical test studies of *Ascochyta pisi* International Journal of Biosciences | IJB |
- 64. Terres Inovia, 2020**
<https://www.terresinovia.fr//diagnostiquerlesmaladiesaeriennesdu-pois-de-printemps1>
- 65. Wang H.S., Wang F., Chang K.F.Turnbul G.D. and howard J.R., 2000.**
Characterization of *Ascochyta* isolates and susceptible of pea cultivars to the *Ascochyta* disease complex in Alberta. Plant pathology 49:5, 540-545.
- 66. Wikimedia, 2008**
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pea_tendrils.jpg?uselang=fr
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:White_pea_flower.jpg?uselang=fr
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diagramme_floral_Pisum.svg?uselang=fr

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière : Microbiologie

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie fongique

Isolement et identification d'*Ascochyta pisi* Lib. agent pathogène de l'antracnose chez le petit pois (*Pisum sativum* L.) et moyens de lutte

Résumé

L'antracnose du petit pois causée par le champignon *Ascochyta pisi* Lib. est l'une des maladies graves dans le monde, provoquant des symptômes qui apparaissent sur toutes les parties aériennes de la plante adulte de petits pois (*Pisum sativum* L.) ; avec des lésions entourées d'un anneau chlorotique jaune qui se transforme en tâches brun foncé sur les feuilles et nécrotique avec un centre rougeâtre sur les gousses, ce qui les rend impropres à la consommation. Notre travail a porté sur l'étude des techniques d'isolement et d'identification d'agent pathogène ainsi que les moyens de lutte pour empêcher le développement du germe après une invasion réussie. La lutte contre l'*Ascochyta pisi* Lib. peut être effectuée biologiquement soit par le mécanisme d'antagonisme, soit par l'utilisation des fongicides qui préviennent les atteintes, ou par l'introduction de gènes résistants au niveau de la plante pour lui donner un pouvoir de résistance.

Mots clés : *Pisum sativum* L., Anthracnose, *Ascochyta pisi* Lib., Isolement, Lutte.

Membre du jury :

Présidente du jury : BOULTIFAT Linda (MCB - UFM Constantine).

Rapporteur : MERGOUD Lilia (MAA- UFM Constantine).

Examinatrice : ZERMANE Férial (MAA - UFM Constantine).

Préparé par :

**Djaout Chiraz
Meziadi Khaoula**

Année universitaire : 2019 -2020