



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

: المكر وبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie

Option : Biotechnologie des Mycètes : Fermentation et production de substances fongiques

INTITULE

**Essai de lutte biologique : Effet de deux champignons antagonistes, sur
l'antracnose du pois chiche « *Ascochyta rabiei* »**

Présenté et soutenu par : BAYOU Rima
BELBAZ Nassira

Le 13/06/2017

Jury d'évaluation :

Président du jury: *Pr. DEHIMAT Laid* (Professeur - UFM Constantine).

Rapporteur: *Dr. OUFROUKH Amar* (MCA – INRAA Constantine).

Tuteur: *Dr. HARRAT Wahiba* (CHERCHEUR – INRAA Constantine).

Examineur: *Dr. ALMI Hiba* (MAB – UFM Constantine).

Année universitaire 2016 - 2017

REMERCIEMENTS

Nous remercions, avant tout " ALLAH " tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour terminer ce travail.

Nous voudrions aussi par ces lignes, exprimer nos vifs remerciements à Monsieur le Pr. DEHIMAT L., pour nous avoir permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions, par sa disponibilité, ses conseils et ses orientations éclairées.

Notre profonde reconnaissance s'adresse également à Monsieur le Dr.OUFROUKH A. et Dr. HARRAT W. pour leur soutien, leur gentillesse mais aussi et surtout pour leur précieuse et conséquente aide apportée durant la réalisation de ce travail. Qu'ils en soient ici profondément remerciés.

Nous remercions également Madame ALMI Hiba, Docteur à l'université frères Mentouri Constantine pour avoir accepté de faire partie du jury et de juger notre travail.

Nos vifs remerciements vont également à toute l'équipe technique de l'UR Constantine, notamment Mlle Boussaha Saoussane, Mme Djamaa Serarma, Mme Saliha Imami et Mme Sihem Bencedira.

Enfin nous adressons nos profonds remerciements à tous ceux qui de près ou de loin, nous ont aidés dans la concrétisation de ce travail

Belbaz N.

Bayou R.

Dédicace

Je dédie avec joie et fierté le fruit de ce travail à ma chère mère qui s'est tant battue pour mon bien être, pour sa bienveillance et sa force qu'elle me transmet pour traverser les plus difficiles épreuves.

A mon cher père pour sa tendresse et sa patience

A ma chère sœur

A mes chers frères : Fayçal, Mostapha, Abdelhalim, Abdelmoumn et Nabil

A mes très chers amis

A tous ceux qui me sont chers

Qu'ils veuillent trouver dans ce travail, résultat des encouragements incessants et des sacrifices qu'ils ont consentis pour mes études. Je leur souhaite tout le succès et le bonheur du monde.

Belbaz N.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à ;

La lumière qui a toujours éclaircie ma vie, Ma Mère

DAHRIA ;

Que le bon dieu de protège et te garde, Mon Père

YOUSSEF ;

Mes Frères, FAYSSAL et HAROUN; Merci pour tous

surtout mon grand frère RAYAD.

Mes sœurs, HOURAYA, GHALYA et RABIHA, Merci pour

vos encouragements.

A mon fiancé RADWAN.

A mes très chers amis et toutes familles

*Qu'ils veuillent trouver dans ce travail, résultat des
encouragements incessants et des sacrifices qu'ils ont
consentis pour mes études. Je leur souhaite tout le succès et
le bonheur du monde.*

BAYOU. R



TABLE DE MATIERES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION 2

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le pois chiche 5

1.1. Historique et origine 5

1.1. Importance dans le monde et en Algérie 5

1.2. Taxonomie 7

1.3. Morphologie de la plante du pois chiche 7

1.4. Variétés du pois chiche 8

1.5. Exigence édapho-climatiques 10

1.6. Principaux stress abiotiques et biotiques du pois chiche 10

2. Anthracnose du pois chiche 11

2.1. Caractéristiques du pathogène 11

2.2. Taxonomie 12

2.3. Symptomatologie 12

2.4. Cycle biologique d'*Ascochyta rabiei* 14

2.5. Moyens de lutte contre la maladie 15

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel 19

1.1. Le matériel fongique pathogène 19

1.2. Matériel fongique antagoniste 19

2. Méthodes 20

2.1. Isolement, purification et identification du pathogène 20

2.2.	Les confrontations sur milieu solide.....	20
2.2.1.	Méthode de confrontation directe	21
2.2.2.	Méthode de confrontation indirecte	22
2.3.	Test de confrontation sur milieu liquide.....	23

RESULTAT ET DISCUSSION

1.	Résultats	26
1.1.	Isolement et identification des champignons à partir du végétal.....	26
1.1.1.	Caractéristiques des champignons isolés	26
1.1.2.	Caractéristiques du pathogène « <i>Ascochyta rabiei</i> ».....	28
1.1.3.	Caractérisation des isolats antagonistes	29
1.2.	Test de confrontation sur milieu solide	30
1.2.1.	Test de confrontation directe.....	30
1.2.2.	Test de confrontation indirecte.....	34
1.3.	Test de confrontation sur milieu liquide.....	37
2.	Discussion	38
	CONCLUSION.....	41
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	44

Résumé

Abstract

-

ANNEXES

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Composition chimique (en % MS) des deux variétés de pois chiche (Maheri-Sis <i>et al.</i> , 2008 et Sanjeewa <i>et al.</i> , 2010).	9
Tableau 2. Croissance mycélienne en mm d' <i>A. rabiei</i> et <i>Trichoderma sp.</i> en fonction du temps	31
Tableau 3. Croissance mycélienne en mm d' <i>Ascochyta rabiei</i> et <i>Aspergillus niger</i> sur 10 jours.....	32
Tableau 4. Croissance mycélienne en mm d' <i>Ascochyta rabiei</i> et <i>Trichoderma sp.</i> sur 10 jours d'incubation.....	34
Tableau 5. Croissance mycélienne en mm d' <i>A. rabiei</i> et <i>A. niger</i> sur 10 jours	35
Tableau 6. Concentration sporale d' <i>A. rabiei</i> en fonction des concentrations des filtrats d' <i>A. niger</i> (Asp) et de <i>Trichoderma sp.</i> (Tr)	37

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Pourcentage de production du pois chiche par continent en 2013 (FAO, 2016).	6
Figure 2. Evolution des superficies récoltées, productions et rendements du pois chiche en Algérie durant la campagne 2010-2014 (FAO, 2016)	6
Figure 3. Description de la plante du pois chiche (Singh et Diwakar, 1995).....	8
Figure 4. Différents types de pois chiche	9
Figure 5. Symptômes de l'antracnose sur les différentes parties de la plante de pois chiche (A) sur feuilles et gousse, (B) sur tige et (C) sur grains.....	13
Figure 6. Cycle biologique de l'antracnose du pois chiche causé par <i>Ascochyta rabiei</i> (Pearse <i>et al.</i> , 2005).....	14
Figure 7. Symptômes d'antracnose sur pois chiche	19
Figure 8. Isolement de l' <i>Ascochyta rabiei</i> à partir de gousses et de grains de pois chiche.....	20
Figure 9. Technique de la confrontation directe sur milieu solide <i>in vitro</i>	21
Figure 10. Méthode de confrontation directe sur milieu <i>in vitro</i>	22
Figure 11. Présentation schématique de la confrontation indirecte.....	22
Figure 12. Préparation de solutions mère du test de confrontation en milieu liquide	23
Figure 13. Préparation de la cellule Malassez	24
Figure 14. Caractéristiques culturales (A1, B1, C1 et D1) et microscopiques (A2, B2, C2 et D2) (G×40) des champignons isolés à partir du végétal respectivement : <i>Chrysosporium sp.</i> (B); <i>Penicillium sp.</i> (C); <i>Cladosporium sp.</i> (D); <i>Fusarium oxysporum</i> (E) 1-Chlamydospore, 2-macrospore, 3-microspore.....	27
Figure 15. Aspects macroscopiques de l'isolat d' <i>Ascochyta rabiei</i> . (A) Sur milieu PDA; (B) sur milieu pois chiche.....	28
Figure 16. Aspect microscopique d' <i>Ascochyta rabiei</i> . (A) Pycnides avec cirrhes sur milieu V8 ; (B) Pycnide éclatée et pycnidiospores (G×10) ; (C) Pycnidiospores (G×40).....	29
Figure 17. Aspect cultural (A1, A2) et microscopique (B1, B2) de <i>Trichoderma sp.</i> et <i>Aspergillus niger</i> respectivement (G×40)	30
Figure 18. Effet de l'antagoniste <i>Trichoderma sp.</i> sur l'agent pathogène <i>Ascochyta rabiei</i> ...	31

Figure 19. Effet de l'antagoniste d' <i>Aspergillus niger</i> sur le développement d' <i>Ascochyta rabiei</i>	32
Figure 20. Confrontation directe d' <i>Ascochyta rabiei</i> avec <i>Aspergillus niger</i> et <i>Trichoderma sp.</i> respectivement (A1, A2) recto et (B1, B2) verso de la boîte	33
Figure 21. Effet de l'antagoniste <i>Trichoderma sp.</i> sur l'agent pathogène <i>Ascochyta rabiei</i> ...	34
Figure 22. Effet de l'antagoniste <i>Aspergillus niger</i> sur le développement d' <i>Ascochyta rabiei</i>	35
Figure 23. Confrontations indirecte d' <i>Ascochyta rabiei</i> avec <i>Aspergillus niger</i> et <i>Trichoderma sp.</i> respectivement (A1, B1) face pathogène et (A2, B2) face antagoniste.....	36
Figure 24. Histogramme de la concentration sporale d' <i>Ascochyta rabiei</i> en fonction des concentrations de filtrats d' <i>A. niger</i> (Asp) et de <i>Trichoderma sp.</i> (Tr).....	37

LISTE DES ABREVIATIONS

°C : degré Celsius

cm: Centimètre

h : Heure

ha: Hectare.

l : litre

J : jour

ml : millilitre

mm : millimètre

mn : Minute

MS : Matière sèche

P.M.G : Poids de 1000 grains

pH : Potentiel d'hydrogène

rpm : Rotation par minute.

µm : micromètre

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les légumineuses occupent une place importante dans les systèmes de cultures. Ces cultures ont un rôle d'une part dans l'enrichissement du sol en azote et d'autre part à leur importance économique et nutritionnelle.

Le pois chiche « *Cicer arietinum* L. » est parmi les espèces de légumineuses les plus cultivées dans le monde. Il occupe la troisième place après le Haricot « *Phaseolus vulgaris* L. » et le pois « *Cicer sativum* L. » (Saxena, 1992). Son importance nutritionnelle relève de sa richesse en protéines et de sa composition en acides aminés qui complète celle des céréales qui occupent, avec le pois chiche, une part importante dans l'alimentation des populations d'Afrique du Nord et d'Asie (Saxena, 1992), pour cela, le pois chiche traditionnellement est appelée «viande du pauvre ».

En Algérie *C. arietinum* occupe la deuxième position après la fève-fêverole. La majeure partie des superficies cultivées de cette espèce est concentrée à l'Ouest du pays, particulièrement, dans les wilayas de Tlemcen et Ain-Temouchent. (MADR, 2014). Le développement de cette culture est limité à cause des conditions climatiques et la non maîtrise des techniques culturales. L'aspect phytosanitaire est l'un des problèmes majeurs de la production souvent attribué aux ravageurs et à plusieurs maladies fongiques causant des pertes de rendement considérables engendrant des conséquences économiques non négligeables. Ces dommages peuvent aussi atteindre la santé humaine par la capacité de ce genre de synthétiser des mycotoxines (Picot *et al.*, 2012).

Parmi ces maladies fongiques, l'antracnose causée par « *Ascochyta rabiei* », peut engendrer des pertes de rendements considérables sur la culture du pois chiche en condition optimales de développement du pathogène.

Différentes méthodes de lutte peuvent être envisagées contre cette maladie : lutte culturale, lutte chimique, lutte génétique et lutte biologique qui représente ici l'objet principal de notre travail. La lutte biologique en utilisant des microorganismes « champignons, bactéries, etc..» ayant un intérêt antagoniste contre certains pathogènes peut avoir un rôle important dans la diminution de l'utilisation des pesticides afin de préserver l'environnement et limiter la résistance des agents pathogènes aux fongicides.

Le choix des microorganismes antagonistes des agents pathogènes est un critère très important pour entreprendre une approche de lutte biologique. Il a été démontré par plusieurs auteurs comme (Tondje *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2007 ; Vinale *et al.*, 2008) que certaines espèces du genre *Trichoderma* ont un potentiel antagoniste significatif contre une large gamme de champignons phytopathogènes. Certaines sont déjà commercialisées pour le contrôle de nombreux agents pathogènes. L'*Aspergillus niger* est lui aussi connu pour être hautement antagoniste vis-à-vis de plusieurs organismes nuisibles et pathogènes (Horn et Wicklow, 1983).

Aussi le travail que présentons ici représente une approche de lutte biologique contre l'agent causal de l'antracnose « *Ascochyta rabiei* », du pois chiche en testant l'effet antagoniste de deux espèces de champignons isolées à partir de pois chiche « *Trichoderma sp.* » et « *Aspergillus niger* ».

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le pois chiche

1.1. Historique et origine

Le pois chiche est originaire du Moyen-Orient, plus précisément du Sud-Est de la Turquie et de la Syrie (Saxena, 1984 ; Singh, 1997). Des restes carbonisés découverts au Proche-Orient indiquent que cette espèce était cultivée au VII^{ème} millénaire avant notre ère avec les céréales, le petit pois et la lentille (Vanier, 2005 ; Redden et Berger, 2007). Cette légumineuse s'est diffusée progressivement vers l'ouest de la Méditerranée, ainsi qu'en Asie orientale et australe et en Afrique de l'Est (Gordon, 2001).

Labdi (1995) mentionne que Davis (1969) et Ladizinsky (1975) ont découvert deux espèces sauvages au Sud-Est de la Turquie «*Cicer echinospernum* Davis et *Cicer reticulatum* Ladiz». Ces deux espèces ne diffèrent pas beaucoup de l'espèce cultivée. Ladizinsky (1989) a identifié à par analyses protéiques et enzymatiques que *Cicer reticulatum* L. (2n = 16 chromosomes) est l'ancêtre spontané de l'espèce cultivée du pois chiche.

En Algérie, le pois chiche a été cultivé avant la colonisation, néanmoins sa culture reste difficile à maîtriser (Laumont et Chevassus, 1956 ; Labdi, 1990).

1.1. Importance dans le monde et en Algérie

Le pois chiche est un aliment de grande valeur nutritive facilement conservable en prévision de périodes de pénurie. Composé de 20% de matières azotées, de 7% de lipides et d'une grande richesse en vitamines et minéraux nécessaires au fonctionnement de nombreuses enzymes impliquées dans différents processus métaboliques (Anonyme 1).

Le pois chiche est principalement produit et consommé dans les pays en voie de développement (95%). En 2013, l'Asie est le continent d'où provient 86,54% de la production mondiale en pois chiche (Fig.1). L'Inde est le premier producteur mondial de pois chiche avec 67% de la production totale. Les autres principaux producteurs de pois chiches au monde sont le Pakistan, la Turquie, le Mexique, le Canada et l'Australie (FAO, 2016).

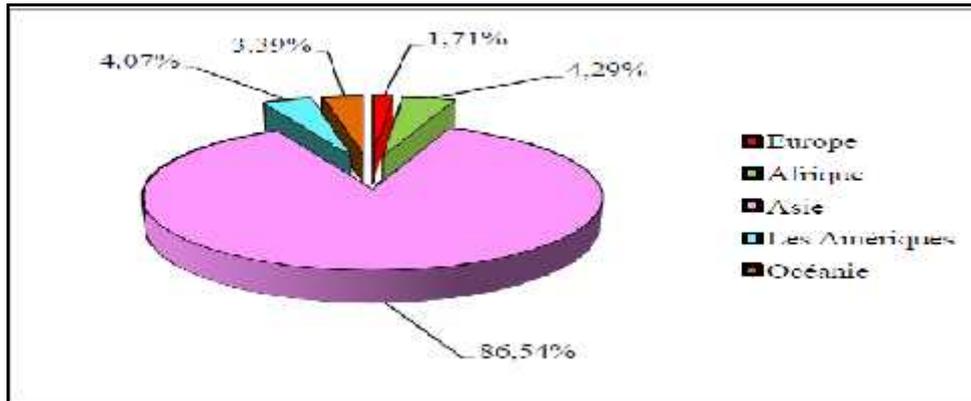


Figure 1. Pourcentage de production du pois chiche par continent en 2013 (FAO, 2016).

En Algérie, la culture des légumineuses et en particulier le pois chiche à un intérêt national, car elle doit permettre de satisfaire les besoins de la population et réduire la facture des importations. En effet, cette culture occupe environ 37,04% de la superficie totale avec un 39,28% de la production légumineuses alimentaire au niveau national.

La production du pois chiche est répartie dans toutes les zones agricoles du Nord algérien. La plus grande part de la superficie nationale, soit plus 48,30%, est située au Nord-Ouest dans les wilayas de Ain Témouchent, Tlemcen et Sidi Bel Abbas.

L'Algérie est classée en quatrième place des pays importateurs de pois chiche. Cette situation est due en première ordre aux superficies récoltées et au manque de maîtrise de l'itinéraire technique (Fig.2).

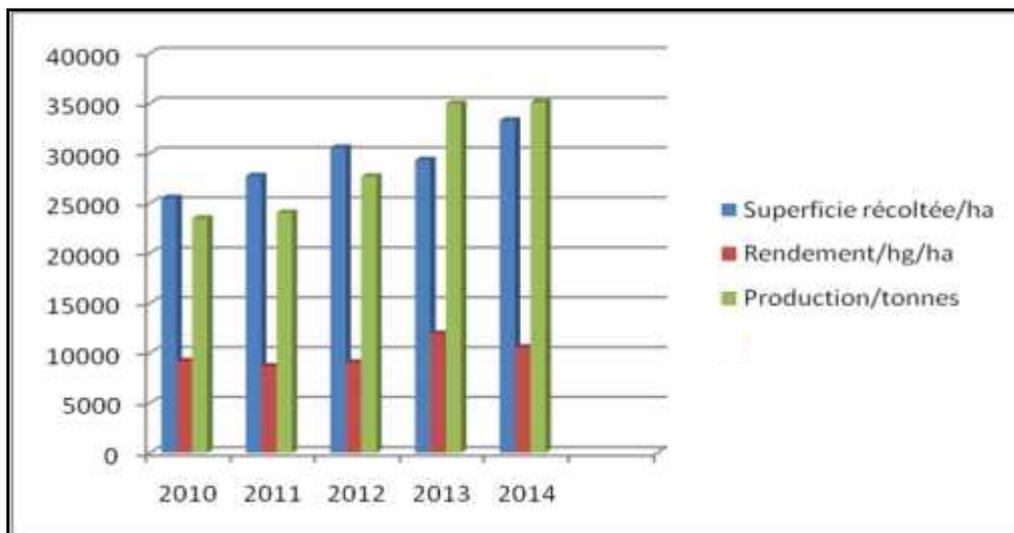


Figure 2. Evolution des superficies récoltées, productions et rendements du pois chiche en Algérie durant la campagne 2010-2014 (FAO, 2016).

1.2. Taxonomie

Le genre *Cicer* comprend un grand nombre d'espèces. Van Der-Maessen (1979) a réparti les espèces du genre *Cicer* en trois groupes : Espèces annuelles sauvages, « *Cicer reticulatum* L.» et « *Cicer echinospermum* P.H.D.», Espèces pérennes sauvages « *Cicer anatolicum* Alef » et une espèce annuelle cultivée « *Cicer arietinum* L. ».

Classification de « *Cicer arietinum* L. » (USDA, 2016) :

Règne:	Plantae
Sous règne:	Tracheobionta (plantes vasculaires).
Embranchement:	Spermatophyta (plantes à graines).
Sous embranchement:	Magnoliophyta (=angiospermes, phanérogames ou plantes à fleurs)
Classe:	Magnoliopsida (ou dicotylédonse).
Sous classe:	Rosidae
Ordre:	Fabales
Famille:	Fabacées
Genre:	<i>Cicer</i>
Espèce:	<i>Cicer arietinum</i> L.
Nom commun:	Pois chiche

1.3. Morphologie de la plante du pois chiche

Le « *Cicer. arietinum* L. », est une espèce herbacée (Fig.3), annuelle, diploïde, autogame, présentant moins de 1% d'hybridation naturelle (Singh et Reddy, 1991).

La plante possède un système racinaire mixte, dont la croissance s'arrête au démarrage de la floraison (Slama, 1998). Il est composé d'une racine principale pivotante qui peut atteindre 1 m de profondeur et des racines secondaires traçantes. La profondeur de l'enracinement dépend des techniques culturales, de l'état et de la nature du sol. En effet, la semelle de labour peut entraver l'élongation de la racine principale (Jaiswal et Singh, 2001). Les racines sont pourvues de nodules qui sont des associations avec des espèces bactériennes rhizobium qui

sont spécifiques au pois chiche et permettent la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique ce qui peut satisfaire jusqu'à 80% des besoins de la plante en azote assimilable et augmenter la fertilité du sol.

Les feuilles ont la forme imparipennée (Poitier, 1981) et sont composées de 7 à 15 folioles ovales et dentelées sans vrilles. Les faces inférieures des feuilles sont couvertes par un duvet.

La tige est herbacée et se ramifie en deux ou trois branches pour donner des ramifications secondaires et tertiaires (Braune *et al.*, 1988).

Les fleurs sont zygomorphes, articulées, solitaires ou en grappe de deux fleurs. Elles s'insèrent sur des pédoncules axillaires à l'aisselle des feuilles (Leport *et al.*, 2006) .

Le fruit est une gousse de forme globuleuse, renflée, ovale, velue, pendante et portant un bec (Ladizinsky, 1987). Elle peut comporter 1 à 3 grains. La germination de la graine est hypogée (Sassene, 1989).

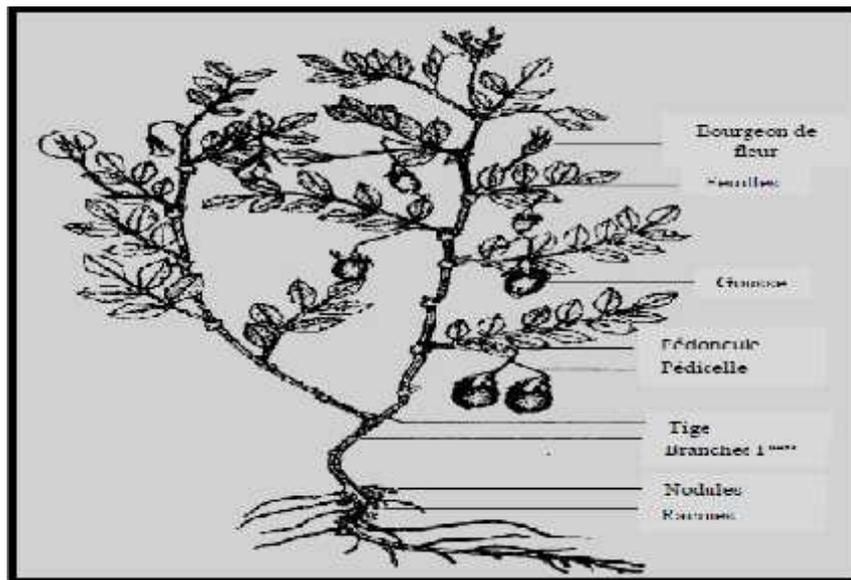


Figure 3. Description de la plante du pois chiche (Singh et Diwakar, 1995).

1.4. Variétés du pois chiche

L'espèce *C. arietinum* manifeste une grande variabilité phénotypique et génotypique et se distinguent en deux types « Kabuli » et « Desi » (Fig.4). Ces deux types se rapprochent du point de vue composition chimique (Tab.1).

- Le type **Kabuli** : essentiellement cultivé et consommé dans le bassin méditerranéen. la plante donne des grains lisses a légèrement ridés, clairs (blanc a jaune pâle) moyen a assez gros (P.M.G > 300 g) recouverts d'un tégument mince(Charly, 2008).
- Le type **Desi** : (85% de la production mondiale) fait partie des habitudes alimentaire de l'Inde ou il y est essentiellement cultivé, mais il est également cultivé, en Ethiopie, Iran, Canada, Mexique et Australie. Le grain est de petit poids (P.M.G > 120 g) avec un tégument épais, dur et coloré (de vert à mauve, brun ou noir) (Charly, 2008).



Figure 4. Différents types de pois chiche

Tableau 1. Composition chimique (en % MS) des deux variétés de pois chiche (Maheris *et al.*, 2008 et Sanjeeva *et al.*, 2010).

Constituants	Variétés de pois chiche	
	<i>Kabuli</i>	<i>Desi</i>
Protéines brutes	24,63	22,76
Amidon	39,12	38,48
Lipides	6,8	6,7
Cendres	2,9	2,8
Sucres soluble	8,43	7,53
Fibres	6,49	9,94
Tannins	0,09	0,12

1.5. Exigences édapho-climatiques

Le pois chiche semble avoir certaines exigences édapho-climatiques telles que :

- **La température** : le pois chiche est assez exigeant en chaleur, la température minimale pour la germination est de 5°C tandis que la température optimale pour la croissance se situe entre 18 à 32°C (Kechache, 2005).
- **La lumière** : l'intensité de la lumière et de la durée d'éclairement sont des facteurs importants pour la nodulation, la fixation d'azote et la floraison (Lie, 1971 *In* Beddar, 1990). Les photopériodes prolongées et les températures élevées accélèrent les phases de développement végétatif et la reproduction (Summerfield *et al.*, 1984).
- **L'eau** : d'après Wery (1990), une consommation en eau de 100 à 150 mm confirme que le pois chiche est doté de bonnes capacités d'extraction de l'eau stockée dans le sol. De plus, Slama (1998) a montré que la période critique en eau du pois chiche est durant les stades de floraison et de remplissage des grains.
- **Le sol** : le pois chiche semble préférer les sols meubles, profonds, plus ou moins argileux avec une bonne capacité de rétention (Saxena, 1987), dont le pH est neutre ou alcalin, variant de 7,3 à 8,2 (Berger *et al.*, 2003). Il ne supporte pas les sols mal drainés qui favorisent le développement de maladies cryptogamiques (Plancquaert et Wery, 1991).

1.6. Principaux stress abiotiques et biotiques du pois chiche

La production du pois chiche est limitée de plusieurs facteurs abiotiques (la salinité, la sécheresse et le froid) et biotiques comme les nématodes tels que « *Pratylenus thornei*, *Meloidogyne incognita* et *Macroposthonia ornata* » qui causent des lésions au niveau des racines, les virus, les bactéries principalement « *Pseudomonas andropogonis* et *Xanthomonas campestris pv cassiae* » (Nene *et al.*, 1996), ainsi que les champignons tels que l'agent causal du flétrissement « *Fusarium oxysporum* », « *Pythium ultimum* » responsable de la fonte de semis et de la pourriture des racines et du collet. D'autres champignons provoquent des dégâts au niveau des parties aériennes de la plante comme « *Botrytis cinerea* » agents de pourriture grise des racines et du collet et « *Ascochyta rabiei* » agent causal de l'antracnose (Nene et Reddy, 1987).

2. Anthracnose du pois chiche

L'origine étymologique du terme anthracnose vient du grec « anthrax », c'est une altération nécrotique des parties aériennes de la plante (Corbaz, 1991).

L'anthracnose du pois chiche causée par *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. forme imparfaite de *Didymella rabiei* (Kovach.) Vou. Arx. (Nene *et al.*, 1996), est une maladie cryptogamique, parasitaire très répandue sur de nombreux végétaux. Cette maladie a été décrite pour la première fois en 1911 par Butler dans le Nord Ouest de l'Inde (Butler, 1918 *In* Chahid *et al.*, 2008).

En Algérie, Bouznad *et al.* (1996), ont noté la présence des agents d'anthracnoses sur l'ensemble des légumineuses à grosses graines : Pois, Fève, Pois chiche, Gesses et Vesces.

L'agent pathogène provoque l'apparition de lésions sur la partie aérienne de la plante; les feuilles, les tiges et les gousses. On risque de voir les rendements baisser si les symptômes se manifestent dans la moitié supérieure de la cime ou si l'humidité est considérable au cours des périodes de végétation, de floraison ou de formation des gousses. Chez les variétés Kabuli et Desi, on peut déplorer jusqu'à 90% et 50%, respectivement, de pertes de rendement (Goodwin, 2008).

2.1. Caractéristiques du pathogène

L'agent de l'anthracnose *Ascochyta rabiei* a été décrit par Labrousse (1930) cité par Chahid *et al.* (2008) comme *Phyllacticta rabiei* parce qu'il a observé les spores non bicellulaires sur l'hôte. En 1931, il a proposé la dénomination actuelle.

Le champignon qui attaque sélectivement le pois chiche persiste dans les résidus de plantes et les semences. Des infections peuvent résulter à partir de spores éoliennes (ascospores) en temps frais et humide. Toutes les parties aériennes de la plante peuvent être soumises à une attaque, il se développe alors des lésions creuses, sombres et allongées. Les lésions se forment souvent sur les tiges, affaiblissent et brisent les branches et les pétioles en provoquant la mort de toutes les parties de la plante au-dessus de la lésion.

Au niveau de la lésion nécrosé le champignon produit des fructifications sous forme de petits points noirs visibles à l'œil nu souvent disposées en anneaux concentriques appelées pycnides.

2.2. Taxonomie

Les espèces du genre *Ascochyta* sont des champignons ascomycètes pathogènes.

Classification d'*Ascochyta rabiei* agent de l'antracnose du pois chiche (Mycobank, 2016) :

Règne :	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Sous-phylum :	Pezizomycotina
Classe:	Dothideomycetes
Sous-classe:	Pleosporomycetidae
Ordre:	Pleosporales
Genre:	<i>Ascochyta</i>
Espèce:	<i>Ascochyta rabiei</i>

2.3. Symptomatologie

Le cycle des anthracoses est caractérisé par une succession de symptômes sur les différents étages des plantes. En plein champ, la maladie apparaît en premier lieu sous forme de plages de couleur jaune à marron. Lorsque les conditions sont favorables, la taille de ces plages augmente rapidement et le champ entier peut être détruit (Sayoud *et al.*, 1999).

Plusieurs auteurs ont décrit les symptômes de l'antracnose du pois chiche; (Weigand *et al.*, 1986 ; Nene *et al.*, 1991 ; Khan *et al.*, 1999 ; Akem, 1999 ; Chongo et Gossen, 2001 et Ilarslan et Dolar, 2002).

Au niveau des folioles les lésions sont nécrotiques de couleur marron-claires, souvent arrondies, bordées d'une marge d'un brun-foncé. Ces macules sont ponctuées de points noirs appelés pycnides. Les folioles atteintes jaunissent, puis tombent. Sur les tiges, les lésions ont souvent une forme elliptique, en cas de fortes attaques, elles confluent et évoluent en une nécrose profonde entraînant la cassure de la tige et le dessèchement de la plante. Aussi au niveau des gousses des lésions arrondies se développent portant des pycnides très distinctes, disposées en cercles concentriques. Les grains attaqués sont souvent échaudés et ont une taille inférieure à celle des grains sains, des taches noirâtres bordées d'une marge irrégulière sont visibles sur leur surface (Fig.5).

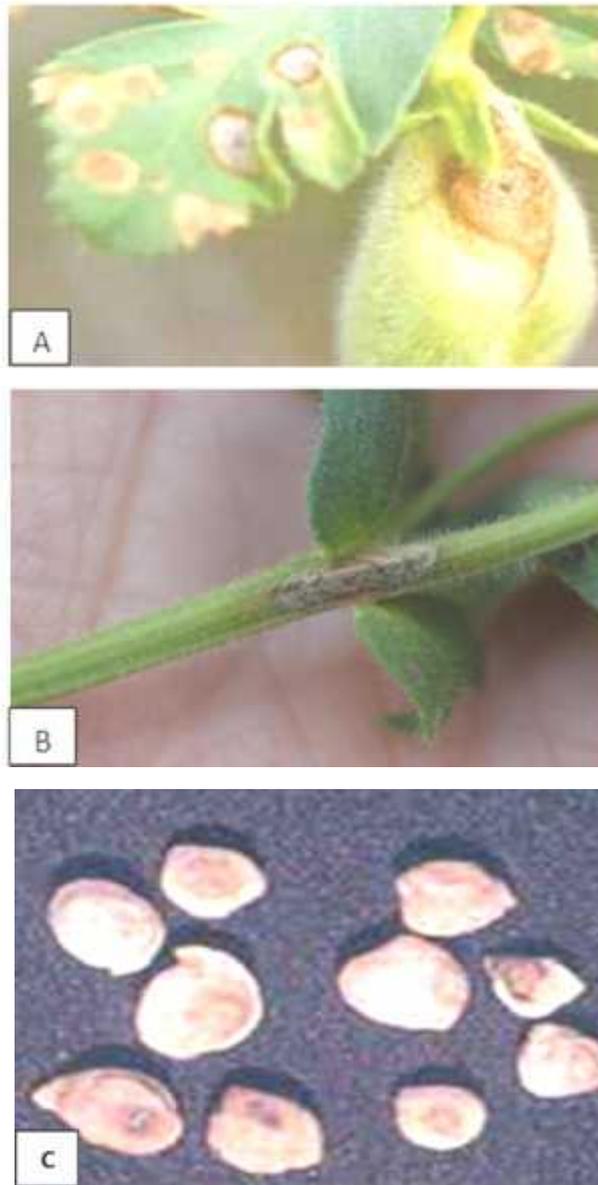


Figure 5. Symptômes de l'antracnose sur les différentes parties de la plante de pois chiche (A) sur feuilles et gousse, (B) sur tige et (C) sur grains (Anonyme 3)

2.4. Cycle biologique d'*Ascochyta rabiei*

L'agent pathogène *A. rabiei* est transmis par les semences et les résidus infectés de la culture précédente. L'inoculum primaire est assuré par la libération de conidies formées à l'intérieur des pycnides et par les ascospores portées par le vent. Durant le cycle les éclaboussures de pluie facilitent la propagation des spores aux plantes voisines. Les spores ont besoin d'au moins 24 heures de pluie ou d'humidité pour germer et infecter le tissu végétal. Au cours de la même saison, on peut compter de nombreux cycles d'infection (Fig.6). L'agent pathogène peut survivre plusieurs années sur les résidus exposés des cultures (Goodwin, 2008).

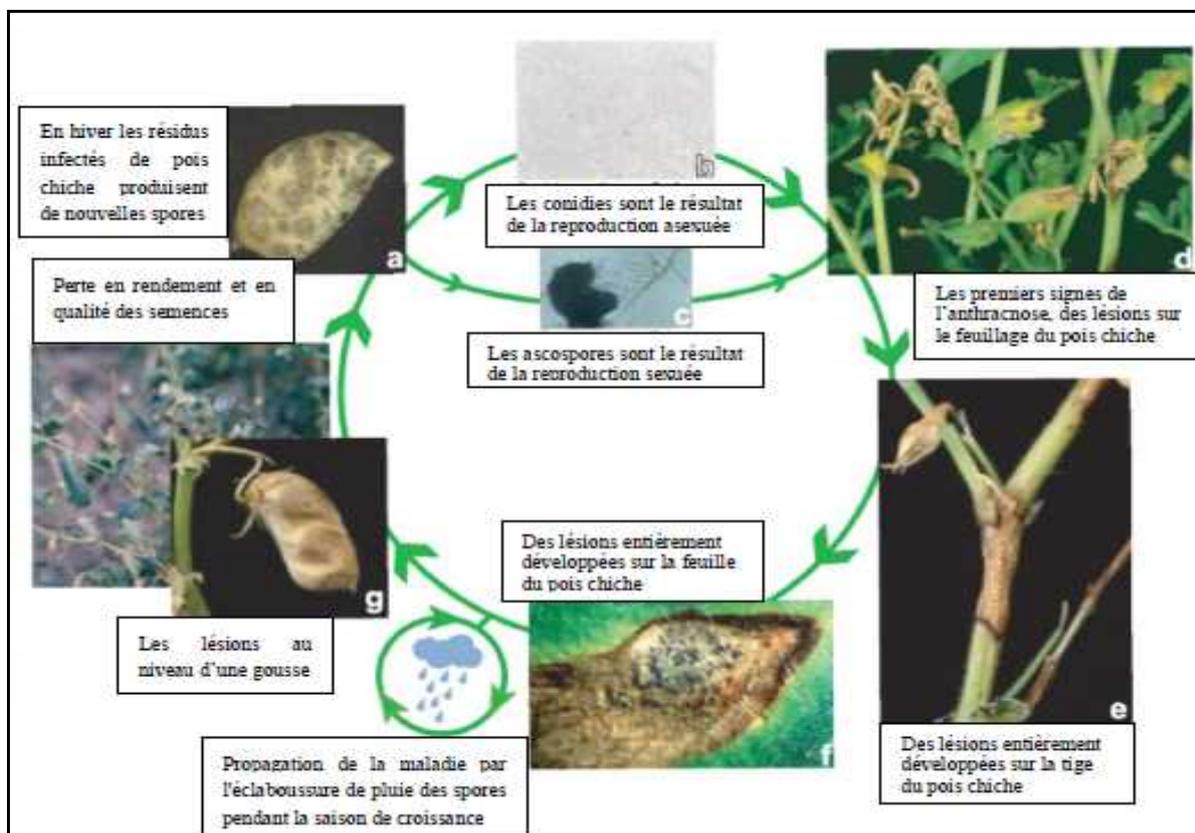


Figure 6. Cycle biologique de l'antracnose du pois chiche causé par *Ascochyta rabiei* (Pearse *et al.*, 2005).

2.5. Moyens de lutte contre la maladie

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

2.5.1. Lutte culturale

Le travail du sol peut aider à accélérer la dégradation des résidus, en détruisant l'inoculum primaire du pathogène. Les débris infectés devraient être retirés du champ si on ne travaille pas le sol. La semence doit être saine et certifiées (Goodwin, 2008).

2.5.2. Lutte chimique

Plusieurs matières actives chimiques utilisées contre *A. rabiei* du pois chiche tels que fludioxinile, thiabendazole, carbathine, chlorothalonil, azoxystrobine, boscalid et pyraclostrobine peuvent aider à réduire les dégâts. (Goodwin, 2008).

2.5.3. Lutte génétique

L'utilisation de variétés de pois chiche tolérantes à l'anthracnose peut aider à élever l'efficacité de la lutte intégrée en retardant l'apparition de la maladie et en bouleversant le cycle répétitif de production et de dissémination des spores (Gossen *et al.*, 2008).

2.5.4. Lutte biologique

a. Généralité sur la lutte biologique

Au début du XX^{ème} siècle l'appellation "lutte biologique" a été proposée pour désigner toute méthode phytosanitaire mettant en œuvre un organisme vivant. En 1919, Smith a défini la lutte biologique comme l'utilisation des ennemis naturels pour le contrôle des maladies phytopathogènes. L'étude de Sanford en 1926 sur les facteurs influençant la pathogénicité de la bactérie *S. scabies* matérialise ce concept en observant que des microorganismes saprophytes pouvaient entraîner une diminution de l'intensité de ce pathogène du sol. Quelques années plus tard, Weindling a démontré que le champignon *Trichoderma lignorum* parasitait d'autres champignons du sol. En 1964, De Bach a donné une nouvelle définition à la lutte biologique : « c'est l'action des parasites, prédateurs ou pathogènes dans le maintien

de la densité de la population des microorganismes à un niveau inférieur de celle observée en leur absence ».

La lutte biologique consiste à combattre une maladie causée par un organisme au moyen d'un autre organisme.

Dans le sens écologique strict, l'application de la lutte biologique peut être considérée comme une stratégie pour restaurer la biodiversité dans les agro-écosystèmes par l'addition des antagonistes naturels (parasite ou prédateur). (Altieri, 1999 ; Nautiyal *et al.*, 2000).

La lutte biologique connaît ces dernières années un regain de popularité dû en partie à un certain échec de la lutte chimique. Les traitements chimiques tels que les fongicides donnent de bons résultats à court terme mais à long terme l'accumulation de leurs résidus dans l'environnement représente un danger qu'on ne peut plus négliger. Par contre, la lutte biologique a une efficacité relative et demande plus de connaissances et d'observations, mais à long terme, elle est beaucoup plus intéressante sur le plan environnemental et économique. (Corbaz, 1990 ; Toussaint, 1996).

b. L'intérêt de la lutte biologique

En plus de son rôle dans la restauration de la biodiversité dans les écosystèmes, la lutte biologique présente un rôle important dans le contrôle des maladies phytopathogènes. Emmert et Handelsman (1999) affirment que la lutte biologique peut être aussi efficace dans le contrôle des maladies phytopathogènes que l'utilisation des fongicides.

Singh *et al.* (2003) ont montré que *Pseudomonas fluorescens* peut réduire de 78% la maladie de la pourriture du collet de la plante de piment rouge causé par *Sclerotium rolfsii*. Également, Mao *et al.* (1998) ont pu réduire en plein champ les maladies de la tomate due aux *S. rolfsii*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* par l'utilisation de deux agents biologiques *Gliocladium vireus* et *Burkholderia cepacia*.

Le genre *Trichoderma* a été particulièrement étudié et plusieurs espèces ont révélé un grand effet antagoniste contre une multitude de maladies, d'autant plus que plusieurs produits phytosanitaires à base d'espèce de ce genre sont commercialisés (Rao et Krishnappa, 1995 ; Kaur et Mukhopadhyay, 1992 ; Fravel, 2005; Errakhi, 2008).

La réussite de la lutte biologique nécessite l'application d'un agent de biocontrôle efficace. L'efficacité est notamment liée à la capacité de l'agent de lutte biologique à coloniser et à s'installer dans le milieu rhizosphérique des plantes (Singh *et al.*, 2003).

MATERIEL ET METHODES

Matériel et méthodes

Ce travail a consisté à évaluer l'effet de deux agents antagonistes sur le développement et la sporulation d'*Ascochyta rabiei*. Pour cela différentes méthodes de confrontation *in vitro* sont testées, à savoir les méthodes de confrontation directe et indirecte sur milieu solide pour la croissance mycélienne, ainsi que l'effet de filtrats des antagonistes sur la sporulation de l'agent pathogène.

1. MATERIEL

1.1. Le matériel fongique pathogène

Les échantillons de pois chiche utilisés au cours de nos différentes expérimentations ont été gracieusement fournis par le laboratoire de l'INRAA - U.R. Elkhroub- Constantine. Ils sont issus des prospections réalisées au niveau de la région de Sidi Bel Abbés (Fig.7).

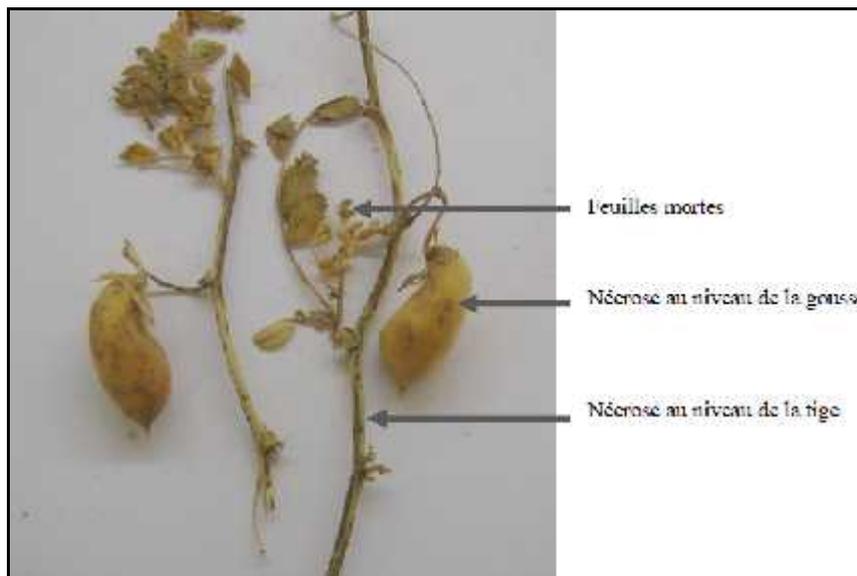


Figure 7. Symptômes d'anthracnose sur pois chiche

1.2. Matériel fongique antagoniste

Les champignons antagonistes testés (*Aspergillus niger* et *Trichoderma sp.*) appartiennent à la collection de l'INRAA – U.R. Constantine. Ils sont isolés à partir de plants de pois chiche.

2. METHODES

2.1. Isolement, purification et identification du pathogène

L'isolement est effectué à partir de gousses et grains de pois chiche. Les échantillons sont découpés en petits fragments et désinfectés superficiellement par trempage dans une solution diluée de l'eau de javel à 2% pendant une minute, puis rincés 2 fois à l'eau distillée stérile pendant 2 minutes pour chaque bain. Les fragments sont par la suite séchés sur papier buvard dans des conditions d'asepsie. Une fois séchés quatre fragments sont déposés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture Potato Dextrose Agar - PDA ou milieu V8 (Annexe1) et mis en incubation à 20 ± 2 °C et une photopériode de 12h (Fig.8). La purification est réalisée dès l'apparition des mycéliums autour des petits fragments, les cultures ressemblant à ceux d'*Ascochyta rabiei* sont repiquées sur milieu PDA. Une fois le champignon purifié des observations microscopiques sont effectuées en utilisant du bleu de méthylène afin d'identifier le pathogène.

Les cultures purifiées sont conservées dans des tubes à essai inclinés contenant PDA à 4°C pour des utilisations ultérieures (Rapilly, 1968).



Figure 8. Isolement de l'*Ascochyta rabiei* à partir de gousses et de grains de pois chiche

2.2. Les confrontations sur milieu solide

L'étude de l'effet antagoniste des deux isolats de *Trichoderma* et *Aspergillus niger* sur l'agent causal de l'antracnose du pois chiche « *Ascochyta rabiei* » est réalisée en utilisant les techniques de confrontation directe et indirecte.

2.2.1. Méthode de confrontation directe

La technique de la confrontation directe décrite par Sivan et Chet (1989). Cette technique consiste à co-ensemencer, dans la même boîte de Pétri contenant un milieu PDA, deux pastilles gélosées prélevées à partir de cultures de l'antagoniste et du pathogène prélevée à partir d'une culture âgée de 7 jours. Les témoins représentent uniquement le pathogène ou l'antagoniste repiqué au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA. Les boîtes sont par la suite incubées à 20°C et une photopériode de 12h pendant 10 jours (Fig.9).

Les notations sont prises chaque jours en mesurant la croissance mycélienne des deux antagonistes en suivant le même sens de mesure (de l'explant vers le centre de la boîte).

Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène est calculé selon la formule de Datta *et al.*, 2004.

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = (\text{R témoin} - \text{R test}) / \text{R témoin} \times 100$$

R_{témoin}: distance radiale max de la croissance du champignon pathogène

R_{test}: distance radiale sur une ligne en direction de l'antagoniste. Après 2 à 10 jours d'incubation la région d'interface a été observée sous microscope optique en vue d'étudier le mode d'action du l'antagoniste testé.

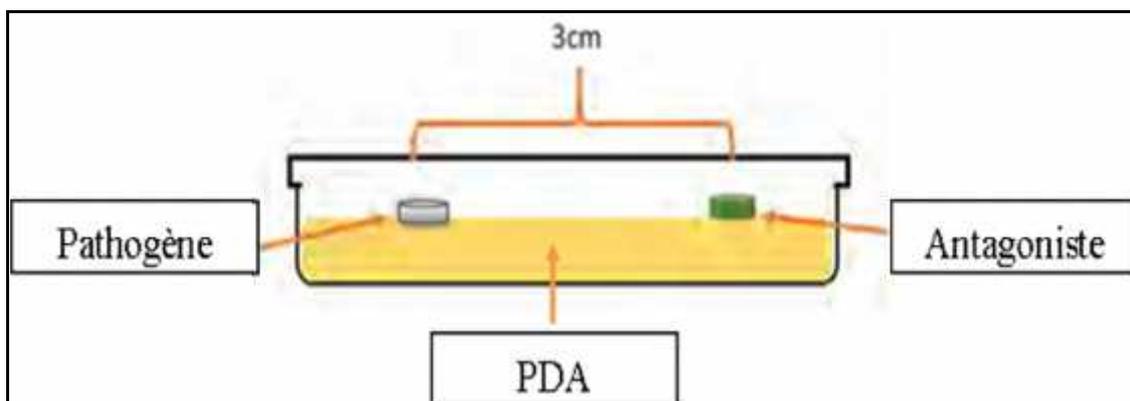


Figure 9. Technique de la confrontation directe sur milieu solide *in vitro*.

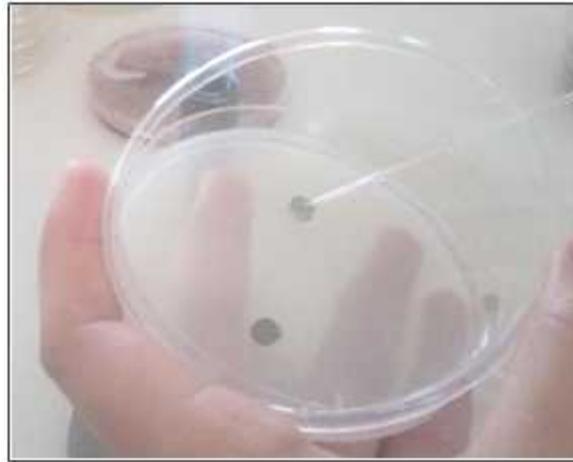


Figure 10. Méthode de confrontation directe sur milieu *in vitro*.

2.2.2. Méthode de confrontation indirecte

Appelée aussi confrontation à distance. Cette méthode consiste à repiquer l'antagoniste et le pathogène dans deux boîtes séparées, un assemblage est réalisé par superposition des deux boîtes, l'antagoniste (*Trichoderma sp.* ou *Aspergillus niger*) en bas et l'*A. rubiei* en haut (Fig.11).

La jonction entre les deux boîtes est assurée par des couches de Parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles. Les conditions de culture sont identiques à celles de la confrontation par contact direct sur milieu de culture.

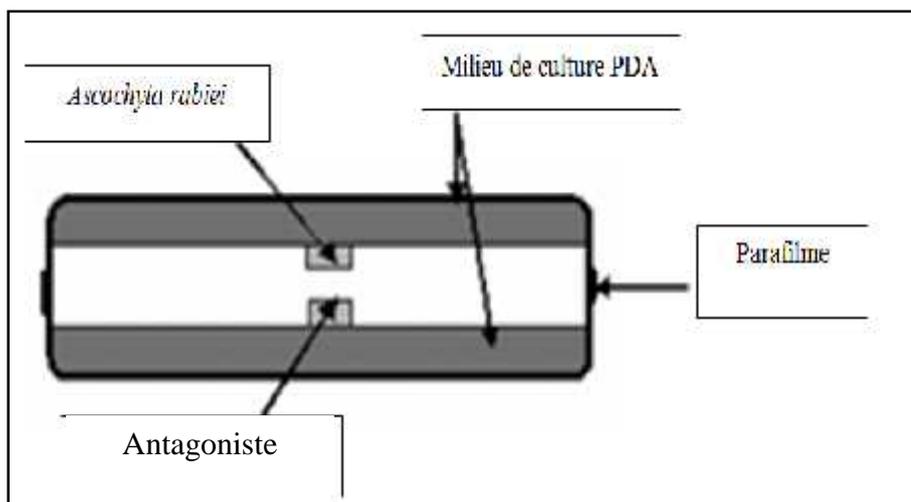


Figure 11. Présentation schématique de la confrontation indirecte.

2.3. Test de confrontation sur milieu liquide

Cette méthode consiste à tester l'effet de différentes concentrations des filtrats de culture des champignons antagonistes testés, sur la sporulation de l'agent pathogène *A. rabiei*.

La technique est réalisée dans des tubes à essai contenant 10 ml du milieu de culture liquide Czapek pois chiche (Annexe.1) et une concentration de filtrat définie. Trois concentrations de filtrat des antagonistes sont testées à savoir 10, 20 et 30%. Trois répétitions de chaque concentration et du témoin sont réalisées (Fig.12).

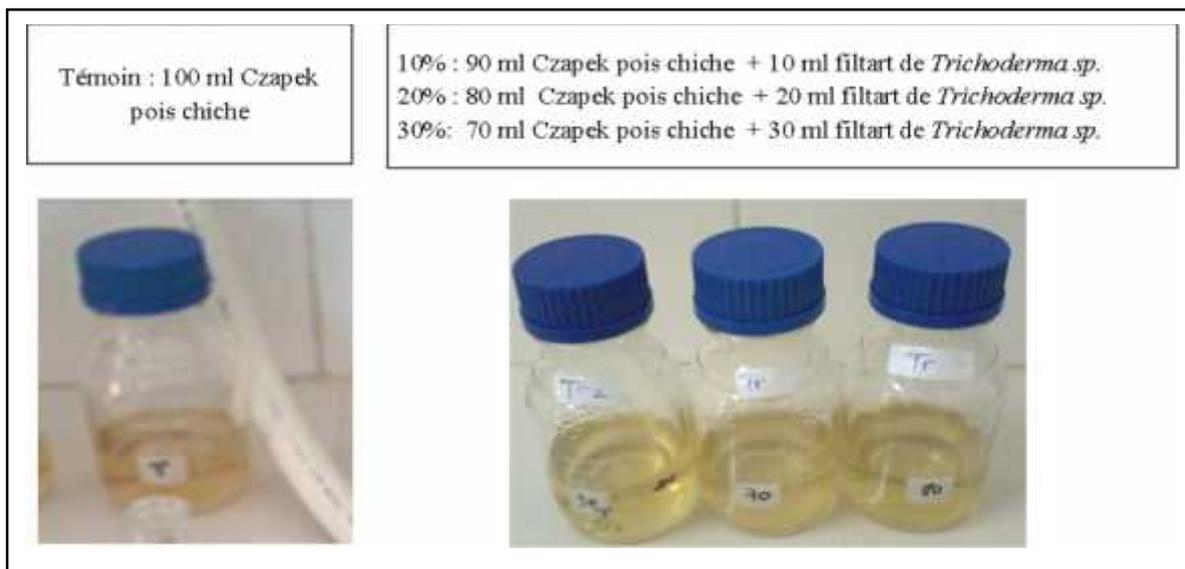


Figure 12. Préparation de solutions mère du test de confrontation en milieu liquide

a- Préparation de l'inoculum du pathogène

Les spores de pathogène sont récupérés par raclage de cultures du pathogènes âgées de 15 jours sur milieu PDA. La concentration sporale est ajustée à 10^6 à l'aide de la cellule Malassez. 1 ml de la suspension sporale est rajouté à chaque tube à essai du test.

b- Préparation du filtrat de culture

Les antagonistes sont cultivés dans un milieu liquide Potato dextrose (Annexe.1) par ensemencement de disques du champignon d'une culture âgée de jours dans 100 ml de milieu. Les erlenmeyer sont fermés hermétiquement et placés dans l'agitateur orbital tournant à 250 rpm pendant 7 jours.

Au bout des 7 jours, la culture est filtrée dans des conditions d'asepsie à l'aide d'un papier Wattman. La suspension obtenue est filtrée ensuite à l'aide d'un filtre de $0,2 \mu\text{m}$ afin de se débarrasser des spores.

c- Mesures

Evaluation de la concentration sporale

Après 15 jours d'incubation, la concentration sporale est mesurée à l'aide d'une cellule Malassez (Fig.13) après agitation des tubes à l'aide d'un vortex.



Figure 13. Préparation de la cellule Malassez

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTAT ET DISCUSSION

1. Résultats

1.1. Isolement et identification des champignons à partir du végétal

L'observation morphologique et microscopique des cultures obtenus des isollements à partir de fragment de plants de pois chiche infectés démontre que les isolats obtenus sont caractéristiques des principaux pathogènes de pois chiche à savoir : *Ascochyta rabiei*, *Fusarium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Chrysosporium sp.* et *Penicillium sp.*

1.1.1. Caractéristiques des champignons isolés

- *Fusarium sp.*

La culture se présente sous forme de mycélium blanchâtre, cotonneuses, légèrement rosâtre. Sous microscope, les macroconidies apparaissent étroites, courbées au sommet, avec 3 à 5 cloisons. Les microconidies en chaînes, fusiformes à piriformes (Fig.14).

- *Cladosporium sp.*

Le *Cladosporium* s'étend en culture mycélienne de couleur brun-olivacée. Ses conidies de couleur sombre sont simples ou branchues. Les conidies sont unicellulaires ou pluricellulaires sont produit en chaine acropétale. Elles sont ovoïdes elliptique ou fusiforme, lisses et verruqueuses (Fig.14).

- *Penicillium sp.*

Ce champignon est caractérisé par un mycélium duveteux, de texture poudreuse et de couleur verte. Les conidiophores sont groupés en faisceaux lâches ou agrégés bien définies (Fig.14). Il peut être simple ou ramifiés, possèdent une forme ressemblant à celle d'un pinceau, les conidies sont disposées en longues chaînes et globuleuse.

- *Chrysosporium sp.*

Le *Chrysosporium sp.* est caractérisé par un mycélium végétatif qui donne naissance à des conidies terminales ou latérales. Les conidies son unicellulaires et ovoïdes (Fig.14).

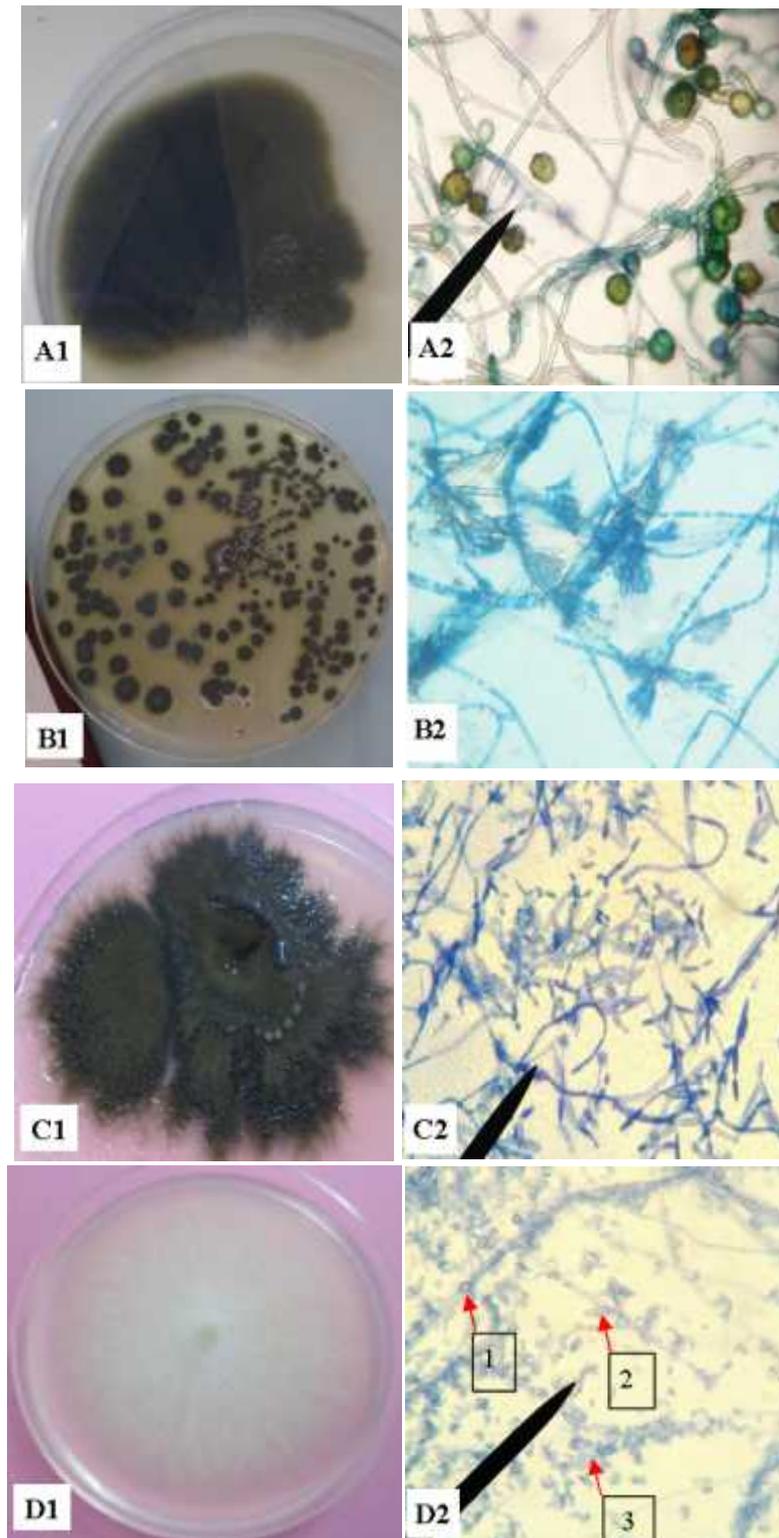


Figure 14. Caractéristiques culturales (A1, B1, C1 et D1) et microscopiques (A2, B2, C2 et D2) ($G \times 40$) des champignons isolés à partir du végétal respectivement : *Chrysosporium sp.* (B); *Penicillium sp.* (C); *Cladosporium sp.* (D); *Fusarium oxysporum* (E) 1-Chlamydospore, 2-macrospore, 3-microspore

1.1.2. Caractéristiques du pathogène « *Ascochyta rabiei* »

L'observation des caractères macroscopiques du mycélium de l'isolat d'*A. rabiei* a révélé l'existence d'un mycélium blanchâtre qui bruni avec le temps pour avoir des cultures noires à marron foncé avec des bords claires. Les thalles sont filamenteux, développés et cloisonnés (Fig.15). De petits points noirs qui sont des pycnides se distinguent sur la culture.

L'observation microscopique des isolats d'*Ascochyta rabiei* a été caractérisée par la présence de pycnidiospores à l'intérieur des pycnides (Fig.16). Le stade imparfait est caractérisé par la formation des pycnides apparaissant sous forme du point noir visibles à l'œil nu, portant des conidies ou pycnidiospores.

- Les pycnides

Elles sont généralement caractérisées sous forme de « carpospores » communément appelées « pycnides », Ils sont globuleux et forment toujours une véritable cavité, leur couleur varie du blanc au brun foncé selon les milieux de culture. Les pycnides sont disposés en cercles concentriques et munies d'un ostiole (Fig.16).

- Les pycnidiospores

Ce sont généralement des conidies qui sortent à maturité en masse des pycnides engluées dans un mucus (Cirrhe). Elles sont hyalines, cylindriques ou ellipsoïdales et ovales à oblongues, les extrémités des conidies sont étroites ou légèrement incurvées et arrondies. Certaines sont bicellulaires présentant une cloison excentrique qui provient des parois latérales mais la plupart sont unicellulaires (Fig.16).

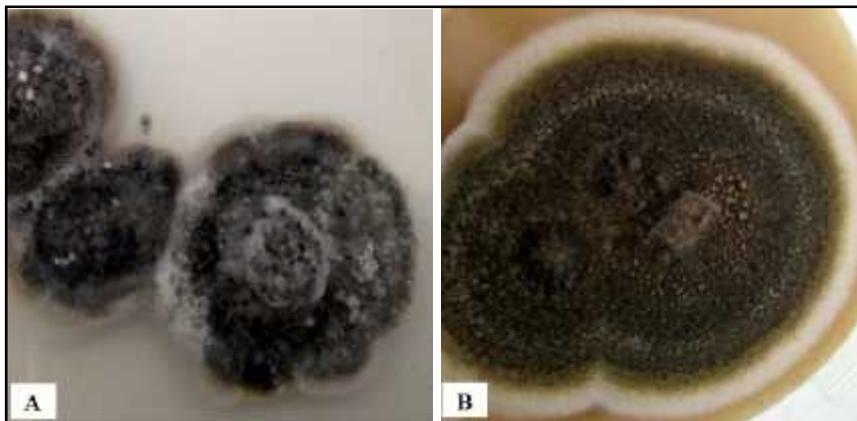


Figure 15. Aspects macroscopiques de l'isolat d'*Ascochyta rabiei*. (A) Sur milieu PDA; (B) sur milieu pois chiche

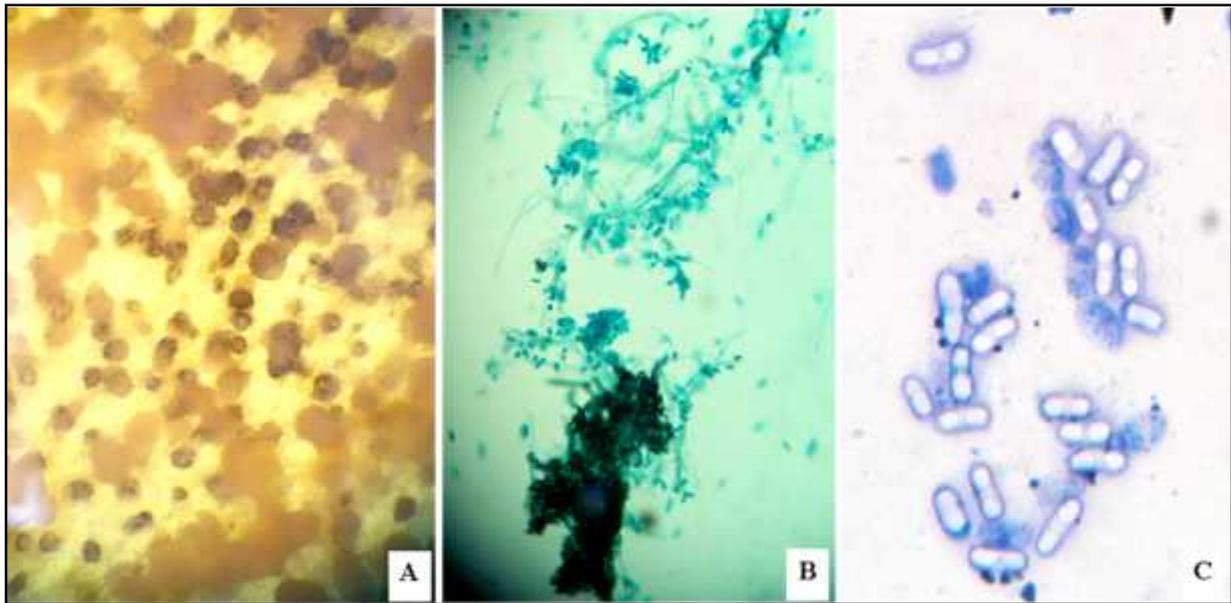


Figure 16. Aspect microscopique d'*Ascochyta rabiei*. (A) Pycnides avec cirrhes sur milieu V8 ; (B) Pycnide éclatée et pycnidiospores (G×10) ; (C) Pycnidiospores (G×40)

1.1.3. Caractérisation des isolats antagonistes

- *Aspergillus niger*

L'*Aspergillus niger* est caractérisé par une culture à mycélium blanchâtre à jaunâtre au début puis granuleuses noires après sporulation. Les conidies sont globuleuses, brunes et échinulées à conidiophore lisse, brunâtre dans sa moitié supérieure et très long. Les têtes aspergillaires sont bisériées avec des métules-phialides tout autour d'une vésicule ronde. Les conidies sont de couleur brune, sphériques et parfois côtelées (Fig.17).

- *Trichoderma sp.*

La culture est caractérisée par la présence d'un mycélium blanchâtre au départ qui devient verdâtre après l'apparition des spores, ces dernières sont vertes, rondes et lisses. Le mycélium est composé d'hyphes septes et ramifiés à parois lisses. Les conidiophores ont une forme conique ou pyramidale, ils sont ramifiés et portent des phialides en forme de flasque ou de quilles qui portent les spores (Fig.17).

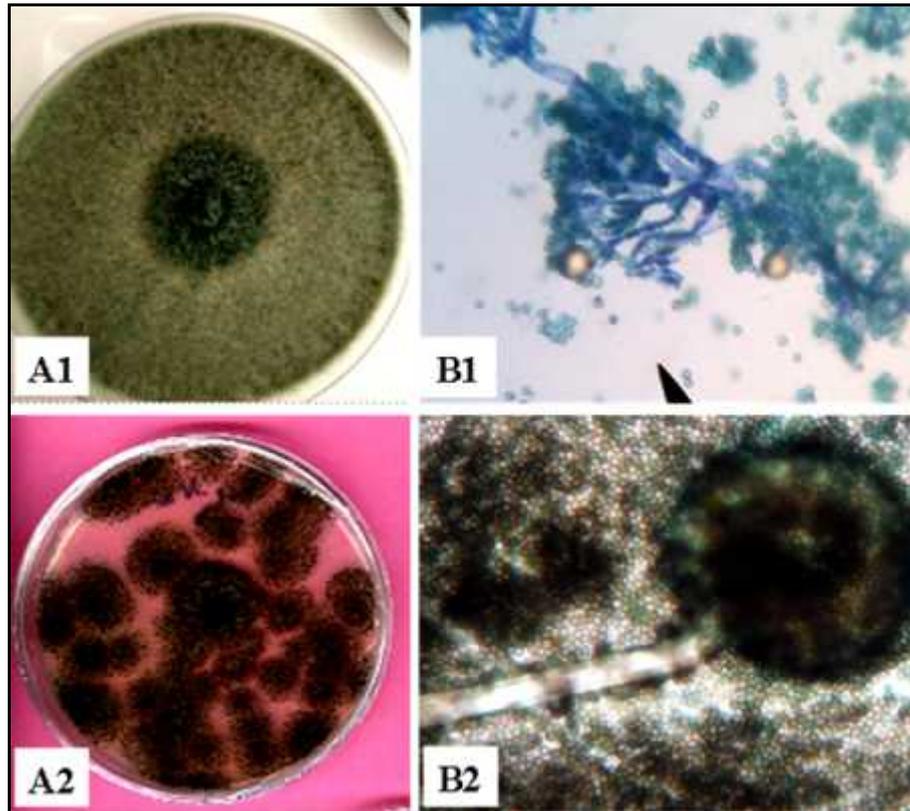


Figure 17. Aspect cultural (A1, A2) et microscopique (B1, B2) de *Trichoderma sp.* et *Aspergillus niger* respectivement (G×40)

1.2. Test de confrontation sur milieu solide

La confrontation directe d'*A. rabiei* avec les deux antagonistes *Trichoderma sp.* et *A. niger*, a révélé des différences dans les effets d'inhibition des antagonistes testés sur le développement du pathogène.

1.2.1. Test de confrontation directe

a. Confrontation directe de l'*A. rabiei* et *Trichoderma sp.*

Les différentes mensurations effectuées au cours du développement des champignons montrent que la croissance mycélienne du pathogène *A. rabiei* est de 6 mm à la fin du 10^{ème} jour d'incubation, en comparant avec le témoin la croissance est réduite de 9 mm. Au bout du 7^{ème} jour un arrêt de la croissance est noté. En ce qui concerne l'agent antagoniste *Trichoderma sp.* la croissance à la fin de l'incubation est de 57 mm, il a rapidement évolué et occupe presque toute la surface de la boîte (Fig.20). Ainsi notre test de confrontation direct

Trichoderma sp. et *A. rabiei* montre une croissance plus rapide et un développement plus envahissant de *Trichoderma sp.* en tant qu'antagoniste, par rapport à *A. rabiei* en tant que pathogène (Fig.18).

Tableau 2. Croissance mycélienne en mm d'*A. rabiei* et *Trichoderma sp.* en fonction du temps

Jours	L'agent pathogène	L'antagoniste <i>Trichoderma sp.</i>	Témoin <i>A. rabiei</i>	Témoin <i>Trichoderma sp.</i>	Pourcentage d'Inhibition (%)
1	2	3,5	2	3	0
2	2,5	9	3	10	16,66
3	4	18	7,5	18	46,66
4	4,5	26,5	8	20	43,75
5	5,25	34,5	9	28	41,66
6	6	45	10	35	40
7	6	55	11,5	40	47,82
8	6	56,5	11,5	41	47,82
9	6	57,5	13,5	42	55,55
10	6	57,5	15	42	66,66

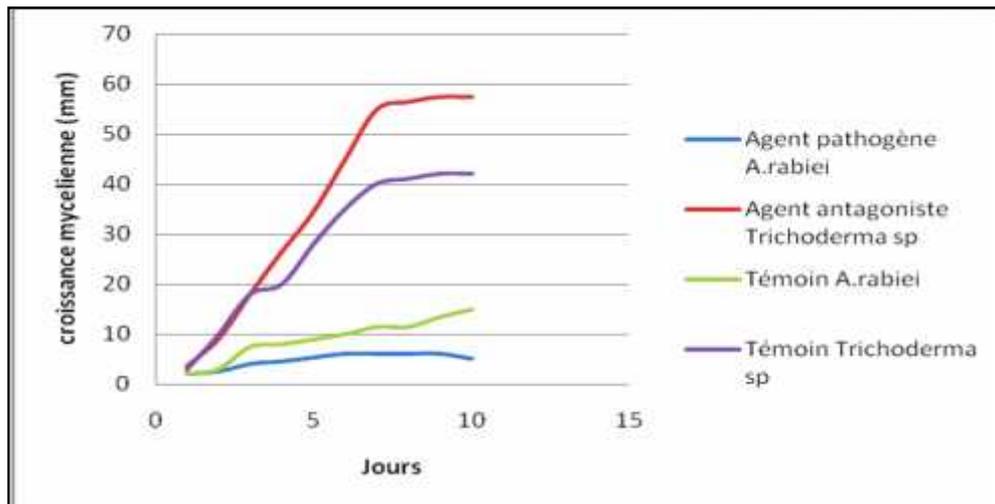


Figure 18. Effet de l'antagoniste *Trichoderma sp.* sur l'agent pathogène *Ascochyta rabiei*.

b. Confrontation directe d'*A. rabiei* et *A. niger*

Les observations effectuées au cours de nos différentes mensurations, montrent que la croissance mycélienne du pathogène *A. rabiei* au 10ème jour est de 9 mm et celle d'*A. niger* étant de 41,5 mm (Tab.3). Ceci qui montre un effet antagoniste certain d'*A. niger* sur *A. rabiei*. Nous remarquerons également que *A. rabiei* est un champignon qui évolue très lentement et son développement au bout de 10 jours d'incubation ne dépasse guère les 15 mm. Des observations similaires ont été constatées lors d'épreuve de confrontation *Trichoderma sp.* sur l'agent pathogène *A. rabiei*.

Tableau 3. Croissance mycélienne en mm d'*Ascochyta rabiei* et *Aspergillus niger* sur 10 jours

Jours	L'agent pathogène <i>A.rabiei</i>	L'antagoniste <i>Aspergillus niger</i>	Témoin <i>A.rabiei</i>	Témoin <i>Aspergillus niger</i>	Pourcentage d'Inhibition (%)
1	2	2	2	2	0
2	2,5	6	3	8	16,66
3	7	9,5	7,5	11	6,66
4	7,5	10,5	8	12	6,25
5	8,5	12	9	13	5,55
6	9,25	14,5	10	13	7,5
7	9,25	25	11,5	14	19,56
8	9	31,5	11,5	29	21,73
9	9	41,5	13,5	43	33,33
10	9	41,5	15	43	40

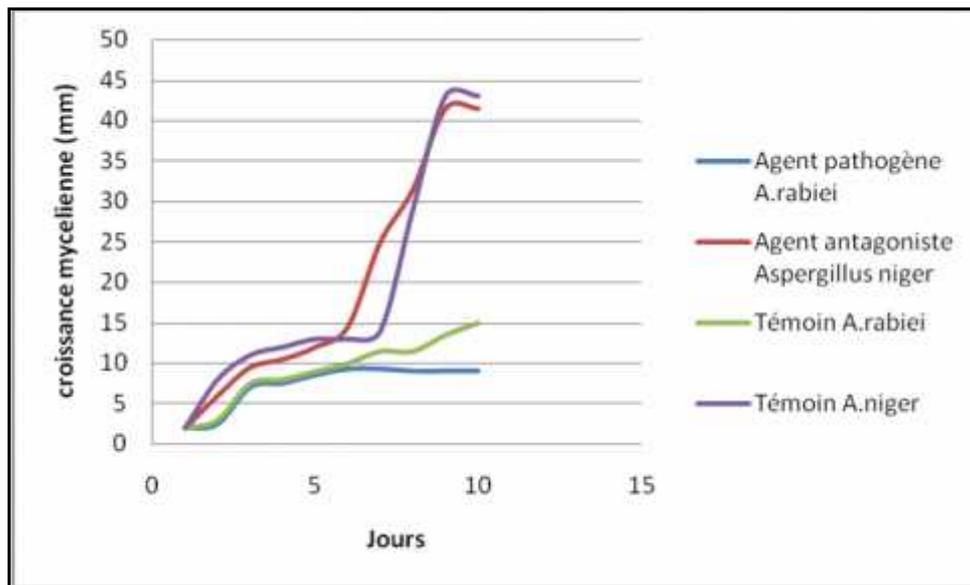


Figure 19. Effet de l'antagoniste d'*Aspergillus niger* sur le développement d'*Ascochyta rabiei*

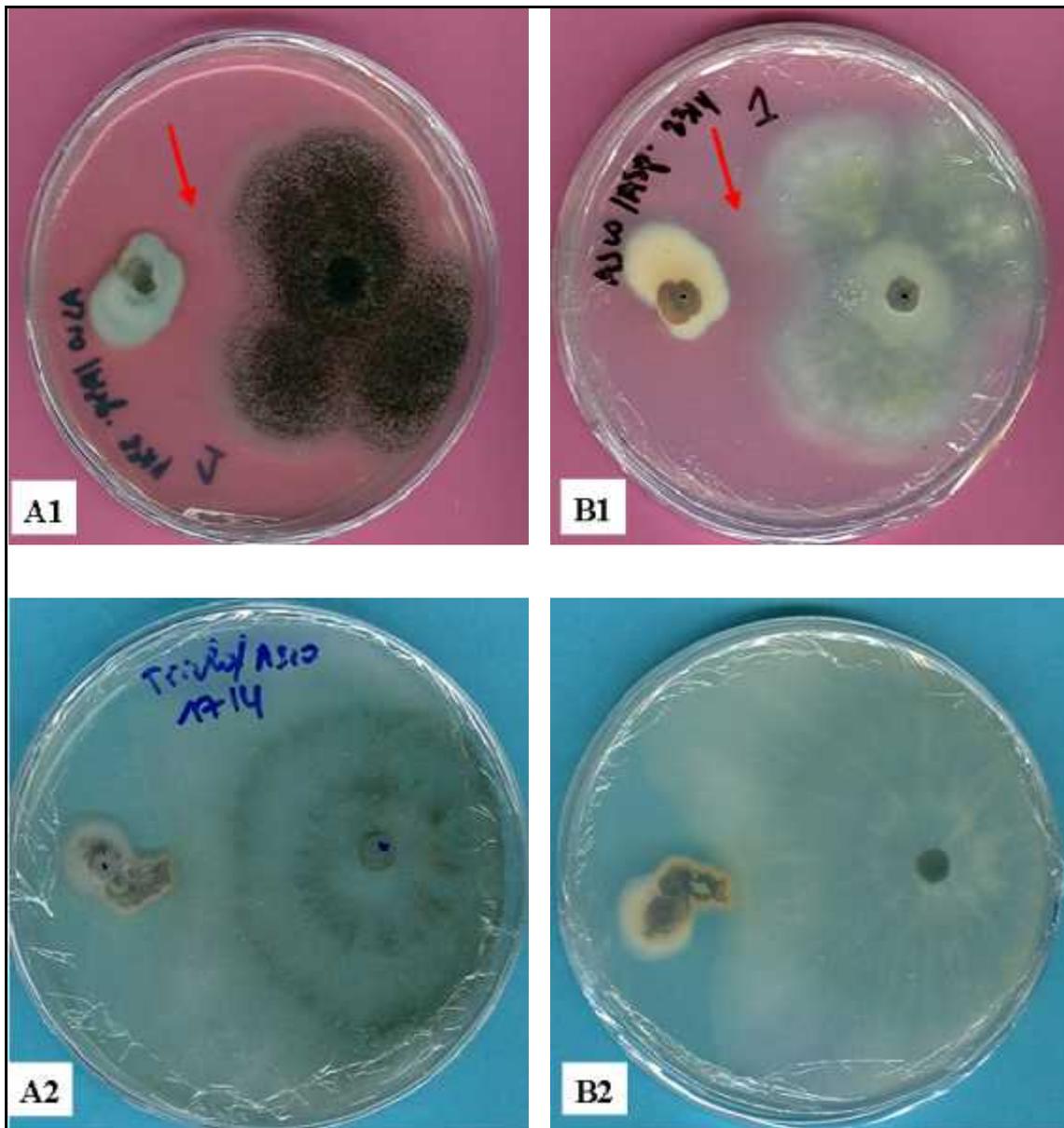


Figure 20. Confrontation directe d'*Ascochyta rabiei* avec *Aspergillus niger* et *Trichoderma sp.* respectivement (A1, A2) recto et (B1, B2) verso de la boîte

*La flèche rouge montre la zone d'inhibition.

1.2.2. Test de confrontation indirecte

a. Confrontation indirecte d'*A. rabiei* et *Trichoderma sp.*

Les résultats obtenus montrent un effet inhibiteur à distance de *Trichoderma sp.* sur la croissance mycélienne d'*A. rabiei* (Fig.23). En effet, la croissance mycélienne d'environ 1 mm/jour du pathogène est inférieure à celle du témoin qui est d'environ 1,5 mm/jour.

Les valeurs des taux d'inhibition 39 à 53% confirment l'existence d'un effet inhibiteur sur la croissance mycélienne de l'agent phytopathogène à distance (Tab.4).

Tableau 4. Croissance mycélienne en mm d'*Ascochyta rabiei* et *Trichoderma sp.* sur 10 jours d'incubation

Jours	L'agent pathogène <i>A. rabiei</i>	L'antagoniste <i>Trichoderma sp.</i>	Témoin <i>A.rabiei</i>	Témoin <i>Trichoderma sp.</i>	Pourcentage d'Inhibition (%)
1	2	3,5	2	3	0
2	3	14	3,5	10	14,28
3	4	21	7,5	18	46,66
4	5,5	37,5	8	20	31,25
5	6	39	9	28	33,33
6	6,5	40,5	10	35	35
7	7	42	11,5	40	39,13
8	7	42	11,5	41	39,13
9	7	42	13,5	42	48,14
10	7	43,5	15	42	53,33

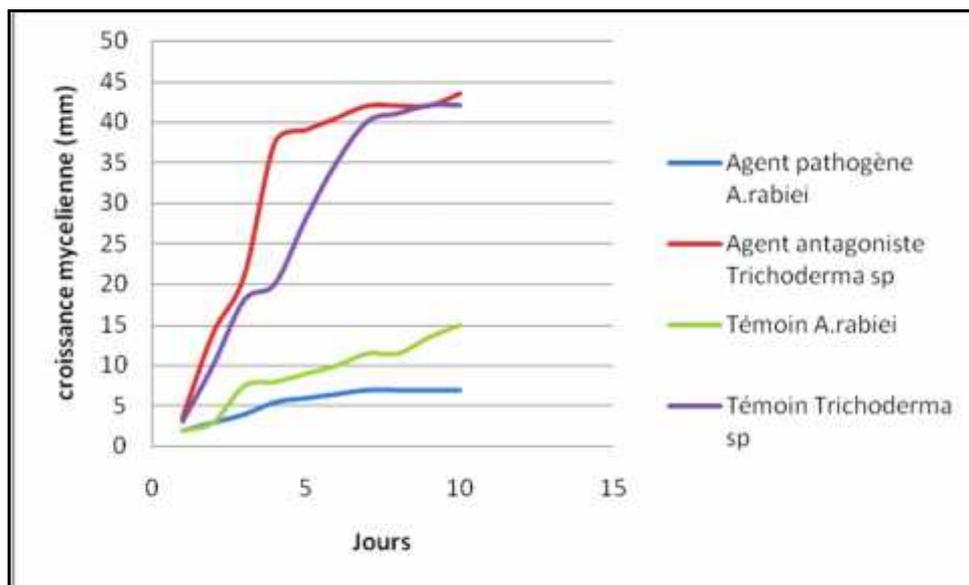


Figure 21. Effet de l'antagoniste *Trichoderma sp.* sur l'agent pathogène *Ascochyta rabiei*

b. Confrontation indirecte de l'*A. rabiei* et *A. niger*

La croissance mycélienne du pathogène est de 5,75 mm à la fin du 10^{ème} jour d'incubation elle est très réduite par rapport au témoin (12 mm) sous l'influence indirecte d'*A. niger* dès le 5^{ème} jour d'incubation. Cette réduction est suivie par un arrêt complet de la croissance de pathogène. En ce qui concerne l'agent antagoniste *Aspergillus niger*, la croissance à la fin de l'incubation est de 43 mm (Tab.5).

Tableau 5. Croissance mycélienne en mm d'*A. rabiei* et *A. niger* sur 10 jours

Jours	L'agent pathogène <i>A.rabiei</i>	L'antagoniste <i>Aspergillus niger</i>	Témoin <i>A.rabiei</i>	Témoin <i>Aspergillus niger</i>	Pourcentage d'Inhibition (%)
1	2	2	2	2	0
2	3	6,5	3,5	8	14,28
3	5	9,5	7,5	11	33,33
4	5	10,5	8	12	37,5
5	5	10,75	9	13	44,44
6	5,5	11,5	10	13	45
7	6	13	11,5	14	47,82
8	6	28	11,5	29	47,82
9	6	40	13,5	43	55,55
10	5,75	43	15	43	61,66

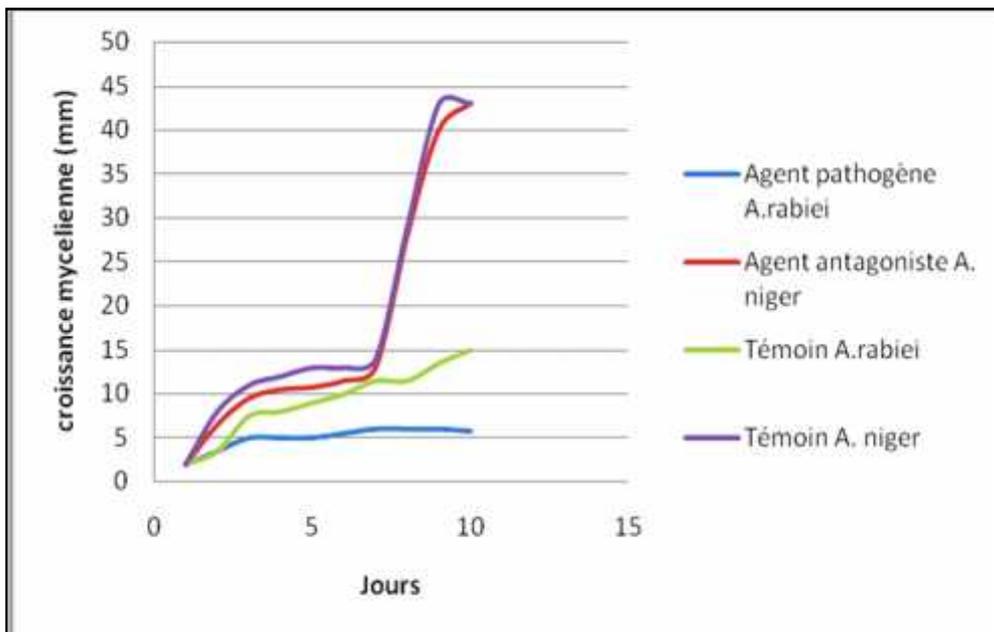


Figure 22. Effet de l'antagoniste *Aspergillus niger* sur le développement d'*Ascochyta rabiei*

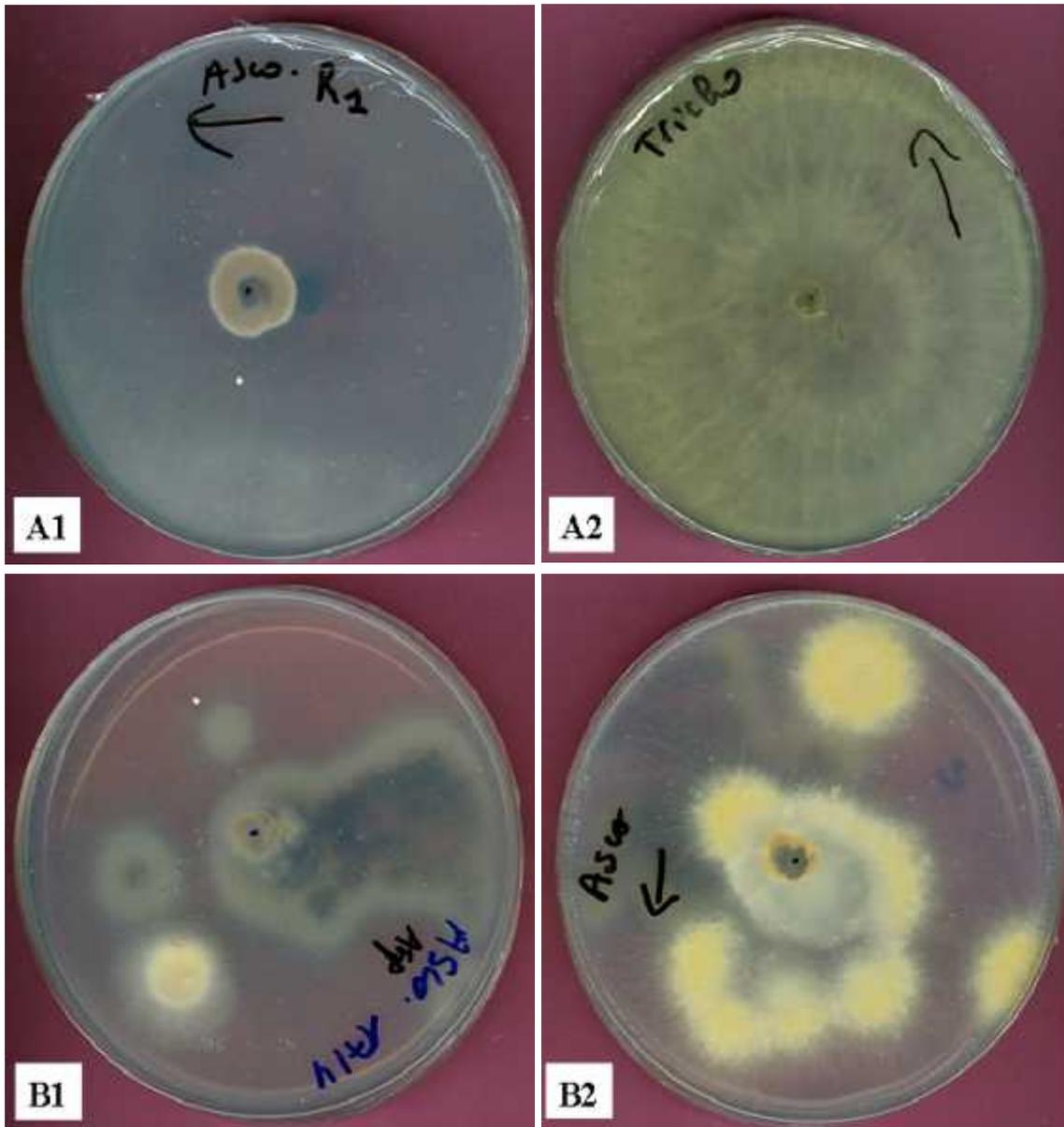


Figure 23. Confrontations indirecte d'*Ascochyta rabiei* avec *Aspergillus niger* et *Trichoderma sp.* respectivement (A1, B1) face pathogène et (A2, B2) face antagoniste.

1.3. Test de confrontation sur milieu liquide

L'effet des filtrats de culture des deux antagonistes sur la sporulation d'*A. rabiei* en milieu liquide est clairement démontré par comptage à l'aide de la cellule Malassez. Les filtrats de *Trichoderma sp.* ont eu un effet inhibiteur supérieur à celui d'*A. niger* (Fig.24). En effet à la concentration 30% de filtrat de *Trichoderma sp.* la suspension sporale est de $2,4 \times 10^5$ et celle chez le filtrat d'*A. niger* à la même concentration est de 16×10^5 (Tab.6).

Tableau 6. Concentration sporale d'*A. rabiei* en fonction des concentrations des filtrats d'*A. niger* (Asp) et de *Trichoderma sp.* (Tr)

Concentration de l'antagoniste/ml	Témoin	Asp 10%	Asp 20%	Asp 30%	Tr 10%	Tr 20%	Tr 30%
Moyenne spore /ml	$241,3 \times 10^6$	$177,9 \times 10^6$	$47,1 \times 10^5$	16×10^5	$24,8 \times 10^5$	$4,8 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$

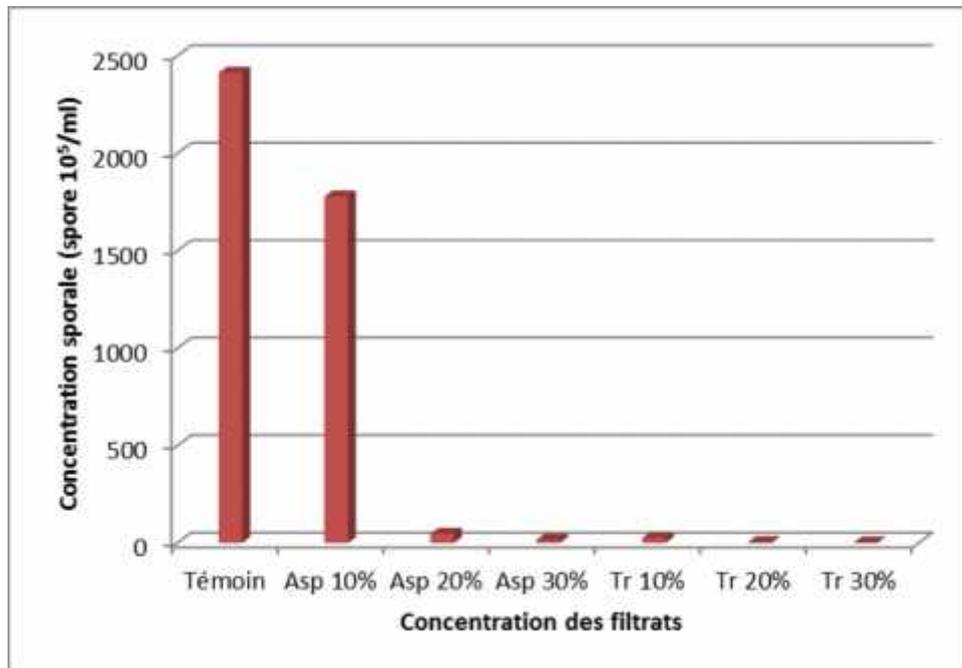


Figure 24. Histogramme de la concentration sporale d'*Ascochyta rabiei* en fonction des concentrations de filtrats d'*A. niger* (Asp) et de *Trichoderma sp.* (Tr)

2. DISCUSSION

Les techniques de confrontation directe et indirecte sur milieu solide nous a permis d'évaluer l'effet de deux antagonistes sur le développement de l'agent pathogènes *Ascochyta rabiei*. Aussi, le test de confrontation en milieu liquide à différentes concentrations de filtrat d'antagonistes, *in vitro*, montre l'effet inhibiteur des deux antagonistes testés sur la sporulation du pathogène.

Les résultats obtenus montrent que les deux antagonistes testés ont un effet inhibiteur important sur le développement et la sporulation de l'agent pathogène. Le *Trichoderma sp.* a révélé un effet inhibiteur supérieur à celui de *A. niger*.

La technique de confrontation en milieu liquide confirme les résultats des confrontations en milieu solide.

L'*A. niger* inhibe les pathogènes des plantes par parasitisme direct, lyse, concurrence pour l'alimentation, antibiose ou indirecte par la production de substances volatiles. Ces mécanismes sont complexes et ce qui a été défini comme biocontrôle est le résultat final de divers mécanismes agissant de manière antagoniste pour contrôle de maladie.

Ces résultats sont en parfaite conformité avec ceux obtenus par Albouvette *et al.* (1983), Dubot (1985) et Davet (1996) qui ont montré que la croissance de *Trichoderma sp.* est plus rapide que celle du pathogène, de ce fait, elle colonise le milieu nutritif et assimile les éléments nutritifs par le phénomène de compétition. Les résultats obtenus peuvent aussi être expliquée par le mécanisme d'antibiose, qui est due à la sécrétion de substances agissant comme étant des antibiotiques et qui inhibent aussi la croissance du pathogène en les diffusant dans le milieu de culture (Tanoh *et al.*, 2015 ; Brunner *et al.*, 2005 ; Sharma, 2011).

D'après Barbosa *et al.* (2001), la production d'amylase par *Trichoderma sp.* est en partie responsable de la croissance rapide des antagonistes sur le milieu PDA. Lors de l'interaction entre les agents pathogènes et certains isolats.

Les résultats obtenus démontrent que même en confrontation indirecte l'antagoniste peut exercer un effet inhibiteur sur le développement du pathogène. L'étude des mécanismes impliqués dans la relation antagoniste a révélé que les *Trichoderma sp.* et *A. niger* a agi par antibiose en libérant des substances volatiles et non volatiles actives sur la croissance mycélienne et la germination des conidies. La production de ces substances par les espèces de *Trichoderma* a été rapportée par Dennis et Webster (1971a, b).

De même, les propriétés antagonistes de *Trichoderma sp.* en produisant des métabolites volatils et non volatils ont inhibé la croissance de divers agents pathogènes telluriques (Reddy *et al.*, 2014). Certains de ces métabolites ont été étudiés ; la production de l'acide harzianique, tricholine, peptaibole, viridine, gliovirine, alaméthicine ont été décrits (Very *et al.*, 2001). Les substances volatiles produites par les antagonistes pourraient diffuser facilement et inhiber la croissance de l'agent pathogène (Wheatley, 2002).

Dans le cas de la confrontation avec l'agent antagoniste *A. niger*, la croissance du pathogène est très lente. Selon Smith et Pateman (1977) ce champignon aurait certaines propriétés antagonistes.

Les résultats des confrontations en milieu liquide confirment ceux des confrontations en milieu solide quant à l'effet des antagonistes testés sur le développement du pathogène.

Selon Harman et Kubicek (1998), l'effet de *Trichoderma* sur la germination des spores a été rapporté par de nombreux travaux. L'antibiotique harzianolide produit par *T. harzianum* inhibe la germination des conidies et des chlamydospores du *fusarium*. La germination des spores d'un certain nombre de champignons est aussi inhibée par la viridine produite par *T. viride*.

En effet, chacune des espèces antagonistes possède une aptitude particulière pour éliminer l'agent pathogène. Les différents modes d'action, l'antibiose et le parasitisme pouvaient être impliqués, simultanément ou séquentiellement.

CONCLUSION

CONCLUSION

L'antracnose du pois chiche causée par *Ascochyta rabiei*, peut engendrer des pertes de rendements considérables sur la culture du pois chiche qui peuvent atteindre jusqu'à 90 % en condition optimales de développement du pathogène. Différentes méthodes de lutte peuvent être utilisées pour endiguer la maladie : lutttes culturales, chimiques, génétiques et biologiques.

Le présent travail qui consiste à étudier l'effet antagoniste *in vitro* de *Trichoderma sp.* et d'*Aspergillus niger* sur la croissance mycélienne et la sporulation d'*Ascochyta rabiei* a révélé des résultats prometteurs pour les différentes techniques adoptées (confrontation directe, indirecte sur milieu solide et sporulation en milieu liquide).

Les résultats indiquent qu'il y a un effet inhibiteur certain exercé par les espèces des *Trichoderma sp.* et *A. niger* étudiées sur le développement d'*A. rabiei*.

Notre étude a montré l'effet antagoniste important de *Trichoderma sp.* soit 66% d'inhibition en confrontation directe et 53% d'inhibition en confrontation indirecte. Avec 40% d'inhibition en confrontation directe et 61% en indirecte, l'*Aspergillus niger* qui n'est pas aussi efficace que le *Trichoderma sp.* , a montré de bonnes aptitudes et reste un bon antagoniste contre l'*A. rabiei*.

Ces résultats sont confirmés par le test de sporulation en utilisant des filtrats de culture des antagonistes en milieu liquide. Toutes les concentrations testées des filtrats de *Trichodema sp.* sont efficaces. Concernant l'*A. niger* la concentration la plus efficace est 30%.

Actuellement beaucoup de recherches se penchent vers la recherche de moyens de lutte, dans la perspective de diminuer l'utilisation abusive de fongicides généralement nocifs à l'environnement et à la santé humaine (résidus de pesticides).

Cette étude d'approche de lutte biologique a montré l'effet important des champignons antagonistes testés sur l'*A. rabiei*. Ces résultats obtenus *in vitro* doivent être confirmés par des tests *in situ* surtout que les variétés de pois chiche utilisées en Algérie sont sensibles à l'antracnose telle que les Flip 88-85 et ICC12-004 (Labdi, 1995).

Enfin ce travail qui est une modeste, contribution à la connaissance de la protection des maladies des légumineuses alimentaires n'est pas une fin en soit, mais un début d'action ou modèle pour d'autres recherches sur d'autres cultures, d'autres pathogènes et

antagonistes, les études plus approfondies sur les métabolites qui induisent l'inhibition du pathogène serait éventuellement appropriée.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Akem C., 1999.** Ascochyta blight of chickpea: Present status and future priorities. *International Journal of Pest management*, 45: 131–137.
2. **Alabouvette C., Couteaudier Yet Lotjvert J., 1983.** Importance des phénomènes de compétition nutritive dans l'antagonisme entre microorganismes. pp: XXIV. Colloque de la société Française de phtopathologie, n° 34, Bordeaux (FR).
3. **Altieri M.A., 1999.** The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agri. Ecosystems Environ.*, 74:19-31.
4. **Barbosa M., Rehm K., Menezes M., Mariano R.L., 2001.** Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characteriza. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32: 98-104.
5. **Beddar N., 1990.** Influence de l'effet inoculation par différentes souches de rhizobium sur l'élaboration du rendement chez le pois chiche (*Cicer arietinum* L.), Variété ILC 3279. Mémoire d'ingénieur agronome, Sétif. 81p.
6. **Benbrook C.M., Groth E., Halloran J.M., Hansen M.K. and Marquardt S., 1996.** Pest management at the crossroads, Consumers Union, Yonkers. 272 p.
7. **Berger J., Abbo S. and Turner N.C., 2003.** Ecogeography of annual wild *Cicer* species: The poor state of the world collection. *Plant Genetic Resources. Crop Sci.* 43: 1076-1090.
8. **Bouznad Z., Maatogui M.E.H. et Labdi M., 1996.** Importance et distribution géographique des maladies fongiques des légumineuses alimentaires en Algérie. In : Ezzahiri B., Lyamany A., Farih A. et El Lyamany M. Symposium régional sur les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires IMP, El Maarif Al Djadida, Rabat, Maroc. pp: 13-19.
9. **Braun Ph., Planquaert Ph. et Wery J., 1988.** Le pois chiche : Utilisation. Ed. ITCF, Montpellier, France. 11 p.
10. **Brunner K., Zeilinger S., Ciliento R., Woo S.L., Lorito M., Kubicek C.P., et al. 2005.** Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Appl Environ Microbiol.*, 71: 3959-3965.

11. **Chahid A.A., Husnain T. et Riazuddin S., 2008.** Ascochyta blight of chickpea: Production of phytotoxins and disease management. *Biotechnol. Adv.*, 26: 511–515.
12. **Chandirasekaran R., 2007.** Option for reducing *A. scochyta* blight severity in chickpea (*Cicer arietinum L.*). Thèse de doctora, Université of Saskatchewan Saskatoon, 161p.
13. **Charly F., 2008.** Chambre d’Agriculture de l’Hérault. Fiche Technique de pois chiche. Production Développée en languedoc Roussillon. Filière Oléo-Protéagineux.
14. **Chongo G. et Gossen B., 2001.** Effect of plant age on resistant to *Ascochyta rabiei* in chickpea. *Canadian J. Plant Pathol.*, 23: 358-363.
15. **Cook R.J., 1993.** Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 31:53–80.
16. **Corbaz R., 1990.** Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. *Presse polytechniques et universitaires romandes.*
17. **Corbaz J., 1991.** Principe de phytopatologie et de lutte contre les maladies des plantes. *Presses phytotechniques et universitaires romandes.* 286 p.
18. **Datta B.S., Das A.K. et Ghosh S.N., 2004.** Fungal antagonists of some plant pathogens. *Mycopathology*, 1: 15 - 17.
19. **Davet P. (1996).** Vie Microbienne Du Sol Et Production Végétales, (*Edn*) Inra. Paris.
20. **Dennis C. and Webster J., 1971a.** Antagonistic properties of specific group of Trichoderma. II. Production of volatile antibiotics. *Trans Br MycolSoc*, 57, pp: 41-48.
21. **Dennis C. and Webster J, 1971b.** Antagonistic properties of species groups of Trichoderma I. Production of non- volatile antibiotics. *Trans. Brit. Mycol. Soc*, 57: 25–39.
22. **Driesche Van R.G. et Bellows T.S., 1996.** Biological control. Chapman and Hall. U.S.A.
23. **Dubot B., 1986.** L’utilisation des *Trichoderma* comme agent de lutte biologique à l’égard de deux parasites aériens : *Chondrostereum purpureum* (Pers.ex Fr) Pouzar (Plomb des arbres fruitiers) et *Botrytis cinerea* Pers.(pourriture grise de la vigne). In : INRA Publ.,Eds. *L’emploi d’ennemis naturels dans la protection des cultures. Les colloques de l’INRA, N°34.* 10 janvier 1985. Versailles (France), pp 37 - 49.

24. **Emmert E.A.B. et Handelsman J., 1999.** Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS. Microbiol. Lett*, 171:1-9.
25. **Errakhi R., 2008.** Contribution d'actinomycètes (Actinobactéries) à la lutte biologique contre *Sclerotium rolfsii* et rôle de l'acide oxalique dans l'induction des mécanismes de défense. Thèse de Doctorat. Université Cadi Ayad, Marrakech Maroc.
26. **FAO Stat, 2013.** Statistical database of the Food and Agriculture Organization of the United Nations.
27. **Fravel D.R., 2005.** Commercialization and implementation of biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol*, 43: 337-359.
28. **Goodwin M., 2008.** Profil de la culture du pois chiche au Canada. Centre pour la lutte antiparasitaire Programme de réduction des risques liés aux pesticides Agriculture et Agroalimentaire Canada 960, avenue Carling, immeuble 57 Ottawa (Ontario) KIA0C6 CANADA.
29. **Gordon M.M., 2001.** Bulletin bimensuel, pois chiche: situation et perspectives, vol. 14, N°3, Canada.
30. **Gossen B., 2008.** Programme de réduction des risques liés aux pesticides, Centre pour la lutte antiparasitaire, Stratégie à risque réduit pour la lutte contre l'ascochytose du pois chiche, Canada. 13p.
31. **Harman G.E. et Kubicek C.P., 1998.** *Trichoderma* and *Gliocladium* (Vol.2). Taylor and Francis Ltd. U.K.
32. **Ilarslan H. et Dolar F.S., 2002.** Histological and ultrastructural changes in leaves and stems of resistant and susceptible chickpea cultivars to *Ascochyta rabiei*. *J. Phytopathol.*, 150: 340-348.
33. **Horn, B. et Wicklow, D.T., 1983.** Factors influencing the inhibition of aflatoxin production in corn by *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 29: 1087-1091.
34. **Jaiswal R. and Singh N.P., 2001.** Plant Regeneration from NaCl Tolerant Callus/Cell Lines of Chickpea, International Chickpea and Pigeonpea, Newsletter 8; ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics); 73 p.

35. **Jayakumar P., Gssen B.D., Gan Y. T., Warkentin T.D., and S. Banniza., 2005.** Ascochyta blight of chickpea: infection and host resistance mechanisms, *Revue canadienne de phytopathologie*, Canada, 27 (4): 499-509.
36. **Khan M.S.A., Ransey M.D., Corbière R., Infanton A., Porta-Puglia A., Bouznad Z. et Scot E.S., 1999.** Ascochyta blight of chickpea in Australia: Identification, pathogenicity and mating type. *Plant pathology*, 48, pp: 230-234.
37. **Kaur N. Pand Mukhopadhyay A. N., 1992.** Integrated control of chickpea wilts Complex by *Trichoderma* spp. And chemical methods in India. *Tropical Pest Management.*, 38, pp: 372- 375.
38. **Kechache. K., 2005.** Contribution à l'étude de l'effet de la fertilisation phosphatée à base des engrais SSP 20% et TSP 46% sur le pois chiche mémoire de fin d'études.
39. **Labdi M., 1990.** Chickpea in Algeria. *in*: Saxena N.P., Saxena M.C., Jouhansen C., Virmani S.M. et Harris H. Adaptation of chickpea in West Asia and North Africa region. ICARDA- ICRISAT. pp: 137-140.
40. **Labdi M., 1995.** Etude de la résistance à l'anthracnose (*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.) chez le pois chiche (*Cicer arietinum* L.). Thèse Doctorat, ENSA, Montpellier, France ; 155p.
41. **Ladizinsky G., 1987.** Pulse domestication before cultivation. *Econ. Bot.*, 41, pp: 60-65.
42. **Ladizinsky G., 1989.** Pulse domestication: Fact and Fiction. *Econ. Bot.* 43, pp: 131-133.
43. **Laumont P., et Chevassus A., 1956.** Note sur l'amélioration du pois chiche en Algérie. Institut Agricole d'Algérie. Maison-carrée, Alger ; 24 p.
44. **Leport L., Turner N.C., Davies S.L. et Siddique K.H.M., 2006.** Variation in pod production and abortion among chickpea cultivars under terminal drought. *Europ. J. Agronomy.* 24, pp: 236-246.
45. **MADR., 2014.** Annuaire statistiques du Ministère de l'Agriculture et du Développement.Rural.
46. **Maheri-Sis N., Chamani, M., Ali-Asghar, S., Mirza-Aghazadeh, A. et Aghajanzadeh A., 2008.** "Nutritional evaluation of kabuli and desi type chickpeas (*Cicer arietinum* L.) for ruminants using in vitro gas production technique." *African Journal of Biotechnology*, 7(16).

47. **Mao W., Lewis A., Lumsden R.D. et Hebbar K.P., 1998.** Biocontrol of selected soilborne diseases of tomato and pepper plants. *Crop Prot.* 17, pp: 535-542.
48. **Nautiyal C.S., 2000.** Biocontrol of plant diseases for agricultural sustainability. *In: Biocontrol potential and its exploration in sustainable agriculture.* Upadhyay R.K., Mukherji K.G., Chamola B.P. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, USA. pp:9-23.
49. **Nene Y.L. et Reddy M.V., 1987.** Chickpea diseases and their control. pp: 233-242, *In. The chickpea* (M.C. Saxena & K.B. Singh. eds).c AB International IC ARDA.
50. **Nene Y.L., Reddy M.V., Haware M.P., Ghanekar A.M. et Amin K.S., 1991.** Field diagnosis of chickpea diseases and their control. *Information Bulletin*, 28; 51p.
51. **Nene Y.L., Sheila V.K. et Sharma S.B., 1996.** A world list of chickpea and pigeonia pathogens. 5^{ème} Edition ICRISAT. Patancheru 502329 India.
52. **Packer H.L. et Thomas C.R., 1990.** Microbiological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. *Biotechnol-Bioenerg*, 35 : 870-881.
53. **Pearse P., Mcvicar R. et Yasionowski J.E., 2005.** *Arriculture de Saskathewan et nourriture*, 200 p.
54. **Picot A., Hourcade - Marcolla D., Barreau C., Pinson - Gadais L., Caron D., Richard - Forget F., Lannou C., 2012.** Interactions between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* in maize ears and consequences for fungal development and mycotoxin accumulation. *Plant Pathology*, 61: 140 - 151.
55. **Plancquaert PH. et Wery J., 1991.** Le pois chiche : Culture et utilisation. Brochure Ed. ITCF, Paris, France ; 11 p.
56. **Poitier G.A., 1981.** Flore de la Tunisie ; 2 tomes ; 1190 p.
57. **Rappily, F., 1968.** Les techniques de mycologie en pathologie végétales. *Ann. Epiphyties.* I.N.R.A. Paris vol. 19, 102 p.
58. **Redden R.J. and Berger J.D., 2007.** History and origin of chickpea. Chickpea breeding and management. *Pathol.*, 42:172–180.
59. **Reddy, B.N., K.V. Saritha et A. Hindumathi, 2014.** *In vitro* screening for antagonistic potential of seven species of *Trichoderma* against different plant pathogenic fungi. *Res. J. Biol.*, 2: 29-36.

60. **Sanford G.B., 1926.** Some factors affecting the pathogenicity of *Actinomyces scabies*, *phytopathol.* 16 p.
61. **Sanjeeva, W. T., Wanasundara, J. P., Pietrasik, Z., and Shand, P. J., 2010.** "Characterization of chickpea (*Cicer arietinum L.*) flours and application in low-fat pork bologna as a model system." *Food Research International*, 43(2): 617-626.
62. **Sassene A., 1989.** Etude de la fertilisation et de l'inoculation du pois chiche. Mémoire d'Ingénieur en Agronomie, INA, Algérie. 77p.
63. **Saxena N.P., 1984.** Chickpea. *In: Goldsworthy P.R., Fisher N.M. The Physiology of Tropical Field Crops.* pp: 419-452.
64. **Saxena M. C., 1992.** Current status and prospects of kabuli chickpea production. *In: Disease Resistance Breeding in Chickpea international Centre for Agricultural Research in the Dry Areas.* Aleppo, Syria. 185p.
65. **Sayoud R., Bouznad Z. et Ezzahiri B., 1999.** Les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires au Maghreb. ITGC, Algérie. 64 p.
66. **Sharma P., 2011.** Complexity of *Trichoderma-Fusarium* interaction and manifestation of biological control. *Aust J Crop Sci.*, 5: 1027–1038.
67. **Singh K.B. and Reddy M.V., 1991.** Advances in disease-resistance breeding in chickpea. *Advances in agronomy.*, 45: 191-222.
68. **Singh K., Diwakar., 1995.** Germplasm Enhancement. *In: Germplasm program legumes. Annual report for 1995.* ICARDA, Aleppo, Syria. pp: 22-24.
69. **Singh K.B., 1997.** Chickpea (*Cicer arietinum L.*). *Field Crops Research*, 53, pp: 161-170.
70. **Singh A., Mehta S., Singh H.B. and Nautiyal C.S., 2003.** Biocontrol of collar rot disease of betelvine (*Piper betle L.*) caused by *Sclerotium rolfsii* by using rhizosphere-competent *Pseudomonas fluorescens* NBRI-N6 and *P. fluorescens* NBRI-N. *Cur. Microbiol.*, 47:153-158.
71. **Sivan A., Chet I., 1989.** Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J. General. Microbiol.*, 135: 675– 682.
72. **Slama F., 1998.** Cultures industrielles et légumineuses à graines. Ed. Centre de diffusion. Universitaire Tunisie, en Arabe. 300 p.

73. **Tondje, P.R., Roberts, D.P., Bon, M.C., Widner, T., Samuels, G.L., Ismaiel, A., Begoude, A.D., M., Bateman, R., Fontem, D. et Hebbar, K.P., 2007.** Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. *Biol. Control*, 43: 202–212.
74. **Toussaint V., 1996.** Caractérisation d'un antibiotique produit par la souche d'actinomycète EF-76 antagoniste à *Phytophthora Fragariae* var. *rubi* causant le pourridié des racines du framboisier. Mémoire de Maitrise ès science. Université de Sherbrooke, Québec, Canada.
75. **Vander-Maessen L.J.G., 1979.** Genetic resources at ICRISAT. Int. Chickpea Newsletter 1. 2p.
76. **Vanier P., 2005.** Le pois chiche au fil du temps : Usages culinaires, Conservation, Jardinage biologique et écologique et environnement. Institut des nutraceutiques et des aliments fonctionnels (INAF), Université Laval. 11p.
77. **Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y. and Valér, J.R., 2007.** Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp., Panoply of biological control. *Biochem. Eng. J.*, 37: 1–20.
78. **Very A., Hoagland R. et Butt T., 2001.** Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential*. Butt TM, Jackson C, Magan N, editors. CAB International, Bristol.
79. **Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti L.E., Marra R., Woo L.S. and Lorito M., 2008.** *Trichoderma* - plant - pathogen interactions. *Soil. Biol. Biochem*, 40: 1-10.
80. **Wheatley R.E., 2002.** The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Anton Leeuw J Microb.*, 81:357–364.
81. **Weignad F., Koster J., Weltzien H.C. and Barz W., 1986.** Accumulation of phytotoxins and isoflavone glucosides in a resistant and susceptible cultivar of *Cicer arietinum* L. during infection with *Ascochyta rabiei*. *Journal pathology*, 115: 214-221.
82. **Wery J., 1990.** Adaptation to frost and drought stress in chickpea and implications in plant breeding. in: Saxena M.C, Cubero J.I. and Wery. Present status and future prospects of chickpea crop production and improvement in the Mediterranean countries, Options Méditerranéennes, Série Séminaires 9, CIHEAM, Paris. pp: 77-85.

Document d'Internet

- **Anonyme 1: 2016** Le Pois chiche, une grande valeur nutritive
<http://www.masantenaturelle.com>.
- **Anonyme 2. MycoBank 2016.**
<http://www.mycobank.org/name/Ascochyta%20rabiei>
- **Anonyme 3.** pea/diseases and pests description uses propagation
<https://www.plantvillage.org/en/topics/chickpea-gram->
- **USDA:** United States Department of Agriculture. 2016.
[https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=CIAR5&di
splay=31](https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=CIAR5&display=31)

ANNEXES

ANNEXES 01

Milieu de culture

) **Milieu de culture: PDA; pH $5,6 \pm 0,2$.**

Composants	Quantités (g/L)
Pomme de terre	200
D-Glucose	20
Agar	20

) **Milieu de culture liquide : Potato Dextrose**

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

) **Milieu de Czapek:** pH=5,6 et le milieu est stérilisé par autoclavage 120°C pendant 20 min).

Composants	Quantités (g/l)
NaNO ₃	3
K ₂ HPO ₄	1
KCL	0,5
MgSO ₄	0,5
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,01
Saccharose	30
Pois chiche bouiller et filtrée	200

) **Milieu V8 Agar**

Composants	Quantités (g/l)
Glucose	10
L-asparagine monohydrate	2
Phosphate de potassium monopotassique	0,5
Chlorure de potassium	0,25
Chlorure de fer	0,01
Eau	900 ml

Résumé

Le pois chiche (*Cicer arietinum L.*) est parmi les légumineuses les plus consommées dans le monde pour leurs protéines et des molécules d'énergie et a une grande importance économique.

Parmi les maladies fongiques qui touchent cette culture, l'antracnose causée par *Ascochyta rabiei*. Cette maladie qui est l'une des plus graves qui touchent les parties aériennes de la plante en Algérie.

Un isolat d'*A. rabiei* est confronté *in vitro* avec deux agents antagonistes (*Trichoderma sp.* et *Aspergillus niger*). Cette étude a révélé l'effet inhibiteur important sur la croissance mycélienne pour les deux méthodes de confrontation directe et indirecte sur milieu solide et la sporulation sur milieu liquide. Le *Trichoderma sp.* a un taux d'inhibition qui atteint les 66% en confrontation directe et 53% en indirecte. Alors que l'effet de l'antagoniste *Aspergillus niger* atteint les 40% en confrontation directe et 61% confrontation indirecte. En ce qui concerne la sporulation, une réduction importante par rapport au témoin surtout au niveau de la concentration 30% de l'antagoniste.

Mots Clés: Pois chiche, Anthracnose, *Ascochyta rabiei*, *Trichoderma sp.*, *Aspergillus niger*, lutte biologique.

Abstract

Chickpea (*Cicer arietinum L.*) is among the most consumed legumes in the world for their proteins and energy molecules and has great economic importance.

Among the fungal diseases that affects this crop, anthracnose caused by *Ascochyta rabiei*. This disease is the most serious one that affects the aerial parts of the plant in Algeria.

An isolate of *A. Rabiei* is confronted in vitro with two antagonistic agents (*Trichoderma sp.* And *Aspergillus niger*). This study revealed the important inhibitory effect on mycelial growth for the two methods of direct and indirect confrontation on solid medium and sporulation on liquid medium. *Trichoderma sp.* Has an inhibition rate which reaches 66% in direct confrontation and 53% in indirect. While the effect of the antagonist *Aspergillus niger* reaches 40% in direct confrontation and 61% indirect confrontation. With regard to sporulation, a significant reduction compared to the control especially at the level of the concentration 30% of the antagonist.

Keyword (s): Chickpea, Anthracnose, *Ascochyta rabiei*, *Trichoderma sp.*, *Aspergillus niger*, Biocontro.

(*Cicer arietinum* L) من بين البقوليات الأكثر استهلاكاً في العالم لاحتوائه على البروتين و جزيئات الطاقة ، ولديه أهمية اقتصادية كبيرة.

من بين الأمراض الفطرية التي تؤثر على هذا المحصول؛ لفحة الاسكوكيثا سببه الفطر *Ascochyta rabiei*. في الجزائر هذا المرض هو أكثر خطورة لأنه يؤثر على الأجزاء الهوائية للنبات.

Ascochyta rabiei يواجه مع عزلتين (*niger Aspergillus Trichoderma sp.*)؛ كشفت هذه الدراسة تأثير كايح بشكل كبير نمو الميسيليوم بطريقتين من المواجهة المباشرة وغير المباشرة في الوسط الصلب والتبوغ في الوسط السائل حيث أن بلغ معدل تثبيط *Trichoderma sp.* 66% في المواجهة المباشرة و 53 في المواجهة غير مباشرة. في حين أن تأثير *Aspergillus niger* 40% في المواجهة المباشرة والمواجهة غير المباشرة إلى 61 . وفيما يتعلق بالتبوغ هناك انخفاض كبير مقارنة بالشاهد خاصة عند التركيز 30

_____ : الحمص، لفحة الاسكوكيثا، المكافحة البيولوجية *Trichoderma Ascochyta rabiei*
Aspergillus niger sp.

Essai de lutte biologique : Effet de deux champignons antagonistes, sur l'antracnose du pois chiche « *Ascochyta rabiei* »

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie - Option : Biotechnologie des Mycètes « Fermentation et production de substances fongiques »

Résumé

Le pois chiche (*Cicer arietinum L.*) est parmi les légumineuses les plus consommées dans le monde pour leurs protéines et des molécules d'énergie et a une grande importance économique.

Parmi les maladies fongiques qui touchent cette culture, l'antracnose causée par *Ascochyta rabiei*. Cette maladie qui est l'une des plus graves qui touchent les parties aériennes de la plante en Algérie.

Un isolat d'*A. rabiei* est confronté *in vitro* avec deux agents antagonistes (*Trichoderma sp.* et *Aspergillus niger*). Cette étude a révélé l'effet inhibiteur important sur la croissance mycélienne pour les deux méthodes de confrontation directe et indirecte sur milieu solide et la sporulation sur milieu liquide. Le *Trichoderma sp.* a un taux d'inhibition qui atteint les 66% en confrontation directe et 53% en indirecte. Alors que l'effet de l'antagoniste *Aspergillus niger* atteint les 40% en confrontation directe et 61% en confrontation indirecte. En ce qui concerne la sporulation, une réduction importante par rapport au témoin surtout au niveau de la concentration 30% de l'antagoniste.

Mots clés : Lutte biologique , Pois chiche , *Ascochyta rabiei*

Laboratoire de recherche : Microbiologie / INRAA-UR Constantine

Jury d'évaluation :

Président du jury : Pr. DEHIMAT Laid (Professeur - UFM Constantine).
Rapporteur : Dr. OUFROUKH Amar (MCA – INRAA Constantine).
Tuteur : Dr. HARRAT Wahiba (CHERCHEUR – INRAA Constantine).
Examineur : Dr. ALMI Hiba (MAB – UFM Constantine).

Date de soutenance : 13/06/2017

