

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abd El Hamid Ibn Badis de Mostaganem

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département d'Agronomie



# THESE

POUR L'OBTENTION DU GRADE  
DE DOCTEUR ES SCIENCES AGRONOMIQUES

Option : Protection des Végétaux

Présentée par :

**M. TIAIBA Ammar**

## Thème

Utilisation de substances naturelles extraites de quelques plantes  
endémiques des régions steppiques algériennes (le Hodna en  
particulier) comme moyen de biocontrôle de l'antracnose des  
légumineuses alimentaires causée par *Ascochyta sp.*

Soutenue publiquement

Devant le Jury :

M. LOTMANI Brahim  
M. BENDAHMANE Boubekour Seddik  
M. YUCEF BENKADA Mokhtar  
M. BELABID Lakhdar  
M. BEKADA Ahmed Mohammed Ali  
M. BEGHALIA Mohamad

|                     |                    |
|---------------------|--------------------|
| Pr. U. Mostaganem   | Président          |
| Pr. U. Mostaganem   | Directeur de thèse |
| Pr. U. Mostaganem   | Examineur          |
| Pr. U. Mascara      | Examineur          |
| Pr. C.U. Tissemsilt | Examineur          |
| Pr. C.U. Tissemsilt | Examineur          |

Année universitaire 2019 - 2020

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

*Même si une thèse est avant tout  
une consécration de longues  
années d'étude, elle n'est pas  
moins une aventure personnelle.*

*A la mémoire de*

*Ma mère et de mon père*

بِسْمِ اللَّهِ

*Ammar*

# Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.

## Mes chaleureux remerciements vont à

- ✓ Mon directeur de thèse, le Professeur Boubekeur Seddik BENDAHMANE, Professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, pour ses directives, ses précieux conseils, son soutien et surtout pour sa patience, qu'il trouve ici toute ma gratitude et ma reconnaissance.
- ✓ M. Brahim LOTMANI, Professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, pour m'avoir honoré de présider le jury de soutenance et de juger mon travail.
- ✓ M. Mokhtar YOUCEF BENKADA, Professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, pour m'avoir honoré de juger mon travail.
- ✓ M. Lakhdar BELABID, Professeur à l'université Mustapha Stambouli de Mascara, pour m'avoir honoré d'examiner ce travail.
- ✓ M. Ahmed Mohammed Ali BEKADA, Professeur au centre universitaire Ahmed Ben Yahia Al-Wancharissi de Tissemsilet, pour m'avoir honoré de faire partie du jury et d'examiner ce travail.
- ✓ M. Mohamad BEGHALIA, Professeur au centre universitaire Ahmed Ben Yahia Al-Wancharissi de Tissemsilet, pour m'avoir honoré d'examiner ce travail.

## Je tiens à remercier également :

- ✓ M<sup>me</sup> Annegret SCHMITT, Professeur à Julius Kühn-Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Deutschland, pour ses directives, son soutien et ses précieux conseils, qu'il trouve ici toute ma gratitude et ma reconnaissance.
- ✓ M. Eckhard KOCH, Professeur à Julius Kühn-Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Deutschland, pour son soutien et ses conseils.
- ✓ M. Weidong CHEN, Professeur au department of plant pathology and USDA-ARS laboratory, Pullman, WA, USA, pour son soutien et ses conseils.
- ✓ M. A. ZEDAM, Maître de conférences à l'université Mohammed Boudiaf de M'sila, pour l'identification des plantes.
- ✓ M. F. MIMECHE, Maître de conférences à l'université Mohammed Boudiaf de M'sila, pour son assistance dans la publication d'article.

- ✓ M. M. DEKHILI, Professeur à l'université Ferhat Abbas de Sétif pour son aide et ses orientations dans les traitements statistiques des résultats.

**En fin je n'oublie pas de remercier :**

- ✓ Mes frères Rabeih et Bachir et mes sœurs Naima, Nadjat, Abla et Lila, pour leur encouragement et surtout leur soutien moral.
- ✓ Mes amis R. ZEMOUL R. BENSAAD, D. MAHIOUT, F. SAIH, M. BOUALAM, A. HENNIA, S.I. AKAKA, R. AISSAOUI, et M. B. FERRAH
- ✓ Tout le personnel laborantin des départements d'agronomie et de biologie de l'université de M'sila
- ✓ Tout le personnel de Julius Kühn-Institut laboratories, Deutschland.
- ✓ Tout le personnel de department of plant pathology and USDA-ARS laboratories, Pullman, WA, USA.
- ✓ Mes étudiantes I. DRISSI, M. DERBALI, A. HASSA, H.TOUKALI et C. THARAFI.
- ✓ Tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration des travaux de cette thèse.

## Résumé

Les travaux de cette thèse consistent à réaliser des bioessais à l'échelle *in-vitro* et à l'échelle *in-vivo* ou *in-planta* dans le but d'étudier l'activité antifongique des extraits végétaux de *Artemisia alba*, *A. campestris*, *Cleome arabica*, *Lycium arabicum*, *Peganum harmala*, *Thapsia garganica*, *Thymelaea hirsuta* et *T. microphylla*, plantes poussant spontanément dans la steppe du Hodna (Algérie), contre *Ascochyta rabiei*, agent de l'ascochytose du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) et *A. pinodes*, *A. pisi* et *Phoma medicaginis* var. *pinodella*, agents responsables de l'ascochytose du pois (*Pisum sativum* L.).

L'évaluation de l'effet *in-vitro* des huit extraits végétaux bruts, appliqués à 1,5, 3 et 6%, sur la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des pycnidiospores des quatre champignons, montre une action qui varie significativement suivant l'origine botanique et la dose de l'extrait. Excepté *A. pisi* qui se montre sensible presque à la majorité des extraits, les meilleurs niveaux d'activité antifongique sont enregistrés avec les extraits de *A. alba*, *L. arabicum* et *P. harmala*.

Le fractionnement des extraits bruts de *A. alba*, de *L. arabicum* et de *P. harmala* et l'étude de l'effet de leurs sous-fractions sur les mêmes paramètres biologiques de *A. rabiei* et *A. pinodes*, révèlent que l'action de l'extrait de *P. harmala* est surtout due à ses alcaloïdes alors que, dans le cas des extraits de *A. alba* et de *L. arabicum*, l'action antifongique est légèrement plus marquée avec leurs composés phénoliques.

A l'échelle *in-vivo*, les traitements des folioles du pois et les plantes du pois chiche avec des extraits bruts de *A. alba* et de *P. harmala* à 1,5, 3 et 6%, s'avèrent efficace, surtout à 6%, sur l'allongement du temps des principales composantes épidémiologiques des agents causals, à savoir la période d'incubation et la période de latence. Ces traitements ont également montré des effets remarquables en réduisant les niveaux de sévérité de la maladie sur pois et sur pois chiche. En dehors d'un traitement fongicide conventionnel, les deux extraits ont fortement réduit la sévérité de l'ascochytose, particulièrement lorsqu'ils sont appliqués à 6%, toutefois l'extrait de *P. harmala*, se montre sensiblement plus efficace que celui de *A. alba*.

**Mots clés :** Extraits végétaux, Activité antifongique, *Ascochyta* sp., Ascochytose, *Pisum sativum*, *Cicer arietinum*

## ملخص

تهدف أعمال هذه الأطروحة إلى إجراء تجارب على المستوى المختبري و على المستوى الإحيائي من أجل دراسة النشاط المضاد للفطريات لمستخلصات *Artemisia alba* و *Artemisia campestris* و *Cleome arabica* و *Lycium arabicum* و *Peganum harmala* و *Thapsia garganica* و *Thymelaea birsuta* و *Thymelaea microphylla* , نباتات تنمو تلقائياً في سهوب الحضنة (الجزائر), ضد *Ascochyta rabiei* مسبب مرض التبقع الأسكوكيتي على الحمص (*Cicer arietinum* L.) و *A. pinodes* و *A. pisi* و *Phoma medicaginis var. pinodella* , الثلاثة يتسببون في نفس المرض لدى البازلاء (*Pisum sativum* L.).

أظهر تقييم التأثير على المستوى المختبري للمستخلصات النباتية الخامة الثمانية، المستعملة بتركيز 1.5 و 3 و 6٪، على النمو وإنتاج الأبواغ و إنباتها للفطريات الأربعة أن هذا النشاط يتغير و يعتمد اعتماداً كبيراً على الأصل النباتي للمستخلص و جرته. باستثناء *A. pisi* التي كانت حساسة لجميع المستخلصات تقريباً ، تم تسجيل أفضل مستويات النشاط المضاد للفطريات بمستخلصات *A. alba* و *L. arabicum* و *P. harmala*.

إن تجزئة هذه المستخلصات الخامة الثلاثة ودراسة تأثير أجزائها الفرعية المختلفة على نفس العوامل البيولوجية لـ *A. rabiei* و *A. pinodes* ، سمحت لنا بالكشف على أن تأثير مستخلص *P. harmala* يرجع إلى القلويات التي تحتويها هذه النبتة ، بينما في حالة مستخلصات *A. alba* و *L. arabicum* ، كان النشاط المضاد للفطريات ملحوظاً أكثر بقليل مع المركبات الفينولية.

على المستوى الإحيائي أو النباتي ، كانت معالجات وريقات البازلاء ونباتات الحمص بالمستخلصات الخام من *A. alba* و *P. harmala* بجرعات 1.5 و 3 و 6 ٪ فعال ضد الإصابة بالتبقع الأسكوكيتي، خاصة جرعة 6 ٪، وهذا نضراً لتمديد وقت المكونات الوبائية الرئيسية للفطريات الممرضة ، أي فترة الحضانة وفترة الكمون. وقد أظهرت هذه العلاجات أيضاً تأثيرات ملحوظة لتخفيضها مستويات شدة المرض سواء على البازلاء أو على الحمص. بغض النظر عن العلاج بالمبيد الفطري التقليدي، قلص كلا المستخلصين بشكل كبير من شدة الإصابة بالتبقع الأسكوكيتي ، خاصة عند المعالجة بجرعة 6 ٪ ، مع الذكر أن مستخلص *P. harmala* أثبت أنه أكثر فاعلية من مستخلص *A. alba*.

**الكلمات الدالة :** مستخلصات نباتية ، النشاط المضاد للفطريات ، *Ascochyta sp.* ، التبقع الأسكوكيتي ، *Pisum sativum* , *Cicer arietinum*

## Abstract

The work of this thesis are to perform an *in-vivo* and *in-vitro* or *in-planta* bioassays in order to study the antifungal activity of plant extracts of *Artemisia alba*, *A. campestris*, *Cleome arabica* *Lycium arabicum*, *Peganum harmala*, *Thapsia garganica*, *Thymelaea hirsuta* and *T. microphylla*, plants growing spontaneously in the steppe of Hodna (Algeria), against *Ascochyta rabiei*, causal agent of ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *A. pinodes*, *A. pisi* and *Phoma medicaginis* var. *pinodella*, causing ascochyta blight of pea (*Pisum sativum* L.).

The evaluation of the *in-vitro* effect of the eight crude plant extracts, applied at 1.5, 3 and 6%, on the mycelial growth, sporulation and germination of the pycnidiospores of the four fungi, shows an action which varies significantly according to the botanical origin and the dose of the extract. Excluding *A. pisi*, which is sensitive to almost all extracts, the best levels of antifungal activity are recorded with extracts of *A. alba*, *L. arabicum* and *P. harmala*.

The fractionation of the crude extracts of *A. alba*, *L. arabicum* and *P. harmala* and the study of the effect of the different sub-fractions on the same biological parameters of *A. rabiei* and *A. pinodes*, reveal that the action of the extract of *P. harmala* is mainly due to its alkaloids whereas, in the case of extracts *A. alba* and *L. arabicum*, the antifungal activity is slightly more marked with their phenolic compounds.

*In-vivo* treatments of pea leaflets and chickpea plants with crude extracts of *A. alba* and *P. harmala* at 1.5, 3 and 6% were effective, especially at 6%, in increasing the time of main epidemiological components of the causal agents, namely the incubation period and the latency period. These treatments have also shown significant effects in reducing the severity levels of pea and chickpea disease. Except from a conventional fungicide, both extracts significantly reduced the severity of ascochyta blight, especially when applied to 6%, however the *P. harmala* extract is significantly more effective than that of *A. alba*.

**Key words:** Plant extracts, Antifungal activity, *Ascochyta* sp., Ascochyta blight, *Pisum sativum*, *Cicer arietinum*

## Liste des Figures et des tableaux

### Liste des figures

| N° | Titre  | Page |
|----|--|------|
| 1  | Représentation simplifiée des interconnexions entre les principales voies métaboliques primaires et secondaires. | 4    |
| 2  | Unité d'isoprène (2-Methyl-1,3-butadiène).   | 5    |
| 3  | Le cycle phénol.   | 7    |
| 4  | L'acide chlorogénique.   | 10   |
| 5  | Structure de base des flavonoïdes et isoflavones.  | 10   |
| 6  | Structure, hydrolyse et produits d'hydrolyse des glucosinolate.  | 14   |
| 7  | Production des légumineuses des principaux pays producteurs. Moyenne. Période 2012-2017.                         | 20   |
| 8  | Production des légumineuses des principaux pays producteurs pour l'an 2017.                                      | 20   |
| 9  | Production algérienne en légumes secs. Période 2011-2016.  | 21   |
| 10 | Production algérienne par culture de légumes secs. Période 2012-2016.  | 21   |
| 11 | Production algérienne de légumineuses consommées vertes. Période 2012-2016.                                      | 22   |
| 12 | Représentation schématique de <i>A. fabae</i>  | 24   |
| 13 | Cycle de l'ascochytose de la fève ( <i>Vicia faba</i> L.).   | 26   |
| 14 | Symptômes de l'ascochytose du pois chiche.   | 29   |
| 15 | Symptômes de l'ascochytose du pois chiche.   | 30   |
| 16 | L'anamorphe et le téléomorphe de <i>D. rabiei</i> .  | 31   |
| 17 | Cycle épidémique de l'ascochytose du pois chiche.  | 33   |
| 18 | Structure des solanapyrones produites par <i>A. rabiei</i> .   | 36   |
| 19 | <i>D. pinodes</i> (anamorphe <i>Ascochyta pinodes</i> ).   | 41   |
| 20 | <i>Phoma medicaginis</i> var. <i>pinodella</i> .   | 42   |
| 21 | <i>Didymella pisi</i> Chilvers & al (anamorphe <i>Ascochyta pisi</i> ).  | 44   |
| 22 | <i>A. pisi</i> Libert.   | 44   |
| 23 | Lésions causées par les trois pathogènes du complexe ascochyta sur <i>Pisum sativum</i> cv. 'Lifter'.            | 47   |
| 24 | Le <i>foot rot</i> causé par <i>M. pinodes</i> sur épicotyle et racines.   | 49   |
| 25 | Lésions nécrotiques dues à <i>A. pisi</i> .  | 50   |
| 26 | Cycle épidémique de l'ascochytose du pois causée par <i>D. pinodes</i> .   | 53   |
| 27 | Micrographie électronique à balayage de la pénétration de <i>D. pinodes</i> .                                    | 54   |
| 28 | Micrographie électronique à transmission des structures infectieuses de <i>D. pinodes</i> .                      | 54   |
| 29 | L'scochitine (C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub> ).  | 55   |
| 30 | La pinolidoxine.   | 56   |

Suite liste des figures

|    |   |     |
|----|---|-----|
| 31 | La pisatine.  | 56  |
| 32 | Situation géographique de la réserve El Mergueb   | 68  |
| 33 | Plantes sources d'extraits.   | 70  |
| 34 | Espèces fongiques, cultures sur <i>Potato Dextrose Agar</i> , âgées de 15 jours.                            | 72  |
| 35 | Représentation du montage d'extraction Soxhlet.   | 76  |
| 36 | Système d'extraction Soxhlet.   | 76  |
| 37 | Système d'évaporation rotative du solvant.  | 77  |
| 38 | Diagramme de fractionnement des extraits végétaux bruts.  | 79  |
| 39 | Plants de pois.   | 86  |
| 40 | Plants de pois de pois chiche.  | 87  |
| 41 | Plants de pois chiche après inoculation.  | 88  |
| 42 | Folioles de pois après inoculation.   | 88  |
| 43 | Echelle de notation des symptômes de l'ascochytose du pois chiche.  | 92  |
| 44 | Echelle de notation des symptômes de l'ascochytose du pois.   | 93  |
| 45 | Effet des extraits végétaux bruts sur la croissance mycélienne de <i>A. rabiei</i> .                        | 100 |
| 46 | Effet des extraits végétaux bruts sur la croissance mycélienne de <i>A. pinodes</i> .                       | 100 |
| 47 | Effet des extraits végétaux bruts sur la croissance mycélienne de <i>P. medicaginis var. pinodella</i> .    | 101 |
| 48 | Effet des extraits végétaux bruts sur la croissance mycélienne de <i>A. pisi</i> .                          | 101 |
| 49 | Effet des extraits végétaux bruts sur la sporulation de <i>A. rabiei</i> .                                  | 103 |
| 50 | Effet des extraits végétaux bruts sur la sporulation de <i>A. pinodes</i> .                                 | 103 |
| 51 | Effet des extraits végétaux bruts sur la sporulation de <i>P. medicaginis var. pinodella</i> .              | 104 |
| 52 | Effet des extraits végétaux bruts sur la sporulation de <i>A. pisi</i> .                                    | 104 |
| 53 | Effet des extraits végétaux bruts sur la germination des conidies de <i>A. rabiei</i> .                     | 106 |
| 54 | Effet des extraits végétaux bruts sur la germination des conidies de <i>A. pinodes</i> .                    | 106 |
| 55 | Effet des extraits végétaux bruts sur la germination des conidies de <i>P. medicaginis var. pinodella</i> . | 107 |
| 56 | Effet des extraits végétaux bruts sur la germination des conidies de <i>A. pisi</i> .                       | 107 |
| 57 | Effet des sous-fractions d'extraits sur la croissance mycélienne de <i>A. rabiei</i> .                      | 109 |
| 58 | Effet des sous-fractions d'extraits végétaux sur la croissance mycélienne de <i>A. pinodes</i> .            | 109 |
| 59 | Effet des sous-fractions d'extraits végétaux sur la sporulation de <i>A. rabiei</i> .                       | 110 |
| 60 | Effet des sous-fractions d'extraits végétaux sur la sporulation de <i>A. pinodes</i> .                      | 110 |

Suite liste des figures

|    |   |     |
|----|---|-----|
| 61 | Effet des sous-fractions d'extraits végétaux sur la germination des conidies de <i>A. rabiei</i> .  | 112 |
| 62 | Effet des sous-fractions d'extraits végétaux sur la germination des conidies de <i>A. pinodes</i> . | 112 |
| 63 | Phytotoxicité des extraits végétaux.  | 122 |
| 64 | Effet des extraits bruts sur la durée d'incubation des pathogènes sur pois                          | 123 |
| 65 | Effet des extraits végétaux bruts sur la durée de latence des pathogènes sur pois.                  | 124 |
| 66 | Effet des extraits végétaux sur la sévérité de l'ascochytose sur folioles détachées pois.           | 126 |
| 67 | Effet des extraits végétaux sur les symptômes de l'ascochytose sur folioles de pois.                | 126 |
| 68 | Effet des extraits végétaux bruts sur la durée d'incubation du pathogène sur pois chiche.           | 127 |
| 69 | Effet des extraits végétaux bruts sur la durée de latence du pathogène sur pois chiche.             | 128 |
| 70 | Effet des extraits végétaux sur la sévérité de l'ascochytose sur pois chiche.                       | 129 |
| 71 | Effet des extraits végétaux sur les symptômes de l'ascochytose sur pois chiche.                     | 130 |

Liste des tableaux

| N° | Titre  | Page |
|----|--|------|
| 1  | Spectre d'action de quelques terpénoïdes   | 7    |
| 2  | Principales classes de composés phénoliques.   | 9    |
| 3  | Teneurs moyennes des graines de légumineuses en différents nutriments.   | 19   |
| 4  | Synthèse des effets d'une période sèche et/ou humide sur le développement de la maladie causée par <i>D. pinodes</i> . | 51   |
| 5  | Composition de base du milieu V8.  | 73   |
| 6  | Composition de base du milieu CSMDA.   | 73   |
| 7  | Composition de base du milieu PDA.   | 73   |
| 8  | Composition du tampon de pH.   | 74   |
| 9  | Dispositif statistique relatif au bioessai <i>in-vitro</i> des extraits végétaux bruts.                                | 94   |
| 10 | Dispositif statistique relatif au bioessai <i>in-vitro</i> des sous-fractions d'extraits.                              | 95   |
| 11 | Dispositif statistique relatif aux bioessais <i>in-vivo</i> .  | 95   |
| 12 | Dispositif statistique relatif aux variables durée d'incubation et durée de latence.                                   | 95   |
| 13 | Rendement en extraits végétaux bruts.  | 96   |
| 14 | Tests phytochimiques.  | 97   |

# TABLE DES MATIERES

|  |      |
|--|------|
| Résumé.....                            | v    |
| م لخص.....                             | vi   |
| Abstract.....                          | vii  |
| Liste des figures et des tableaux..... | viii |
| Introduction générale.....             | xvi  |

## *Première partie : Revue bibliographique*

|   |    |
|---|----|
| <i>Chapitre I : Utilisation des substances végétales dans la protection des plantes</i> ..... | 1  |
| I-1. Introduction.....  | 1  |
| I-2. Historique.....  | 1  |
| I-3. Métabolisme secondaire chez les végétaux.....  | 3  |
| I-3-1. Terpènes.....  | 5  |
| I-3-2. Composés phénoliques.....  | 7  |
| I-3-3. Composés contenant de l'azote.....   | 11 |
| I-3-3-1. Alcaloïdes.....  | 11 |
| I-3-3-2. Glycosides et glucosinolates.....  | 13 |
| I-4. Conclusion.....  | 15 |
| <i>Chapitre II : L'ascochytose des légumineuses alimentaires</i> .....                        | 17 |
| II-1. Les légumineuses alimentaires.....  | 17 |
| II-1-1. Introduction.....   | 17 |
| II-1-2. Botanique.....  | 18 |
| II-1-3. Intérêt nutritionnel.....   | 18 |
| II-1-4. Importance.....   | 19 |
| II-1-4-1. Dans le monde.....  | 19 |
| II-1-4-2. En Algérie.....   | 19 |
| II-2. L'ascochytose.....  | 22 |
| II-2-1. Introduction.....   | 22 |
| II-2-2. Ascochytose de la fève.....   | 24 |
| II-2-3. Ascochytose de la lentille.....   | 27 |
| II-2-4. Ascochytose du pois chiche.....   | 28 |
| II-2-4-1. Symptômes.....  | 28 |
| II-2-4-2. Agent causal.....   | 29 |

|  |    |
|--|----|
| <b>II-2-4-3. Taxonomie</b> .....   | 31 |
| <b>II-2-4-4. Epidémiologie</b> .....   | 32 |
| <b>a. Gamme d'hôte</b> .....   | 32 |
| <b>b. Survie et conservation</b> .....   | 32 |
| <b>c. Cycle épidémique</b> .....   | 32 |
| <b>d. Voie d'infection</b> .....   | 33 |
| <b>II-2-4-5. Processus infectieux et histopathologie</b> .....                         | 34 |
| <b>a. Adhésion et pénétration</b> .....  | 34 |
| <b>b. Phytotoxines</b> .....   | 34 |
| <b>II-2-4-6. Variabilité pathogénique</b> .....  | 35 |
| <b>II-2-4-7. Réponse de l'hôte</b> .....   | 36 |
| <b>a. Caractères anatomiques</b> .....   | 37 |
| <b>b. Caractères physiologiques et biochimiques</b> .....                              | 37 |
| <b>c. Pathogenesis Related Proteins (PRP) = Protéines Liées à la Pathogénèse</b> ..... | 38 |
| <b>II-2-5. Ascochytose du pois</b> .....   | 38 |
| <b>II-2-5-1. Agent causal</b> .....  | 39 |
| <b>a. <i>Mycosphaerella pinodes</i></b> .....  | 39 |
| <b>b. <i>Phoma medicaginis</i> var. <i>pinodella</i></b> .....                         | 41 |
| <b>c. <i>Ascochyta pisi</i></b> .....  | 43 |
| <b>II-2-5-2. Taxonomie</b> .....   | 45 |
| <b>II-2-5-3. Interaction et coexistence des agents du complexe ascochyta</b> .....     | 46 |
| <b>II-2-5-4. Symptômes</b> .....   | 46 |
| <b>a. Symptômes dus à <i>M. pinodes</i></b> .....                                      | 48 |
| <b>b. Symptômes dus à <i>P. medicaginis</i> var <i>pinodella</i></b> .....             | 48 |
| <b>c. Symptômes dues à <i>A. pisi</i></b> .....  | 49 |
| <b>II-2-5-5. Epidémiologie</b> .....   | 50 |
| <b>a. Facteurs influençant le développement de la maladie</b> .....                    | 50 |
| <b>b. Cycle de la maladie</b> .....  | 52 |
| <b>II-2-5-6. Processus infectieux</b> .....  | 53 |
| <b>a. Rôle des enzymes</b> .....   | 54 |
| <b>b. Rôle des toxines</b> .....   | 55 |
| <b>II-2-5-7. Réponse de l'hôte</b> .....   | 56 |
| <b>a. Les phytoalexines</b> .....  | 56 |
| <b>b. Les chitinases</b> .....   | 57 |
| <b>II-2-6. Méthodes et Moyens de Lutte</b> .....                                       | 58 |
| <b>II-2-6-1. La lutte culturale</b> .....  | 59 |
| <b>II-2-6-2. La lutte chimique</b> .....   | 60 |
| <b>a. Traitement de semences</b> .....   | 60 |
| <b>b. Fongicides foliaires</b> .....   | 61 |
| <b>II-2-6-3. Résistance et sélection variétale</b> .....                               | 63 |
| <b>II-2-6-4. La lutte biologique</b> .....   | 64 |
| <b>II-2-6-5. Gestion intégrée de la maladie</b> .....                                  | 65 |

## Deuxième partie : Matériel et méthodes

|   |    |
|---|----|
| <b>Chapitre I : Matériel biologiques</b> .....  | 67 |
| <b>I-1. Plantes source d'extraits</b> .....   | 67 |
| <b>I-1.1. <i>Artemisia alba</i> Turra</b> .....   | 67 |
| <b>I-1.2. <i>Artemisia campestris</i> L.</b> .....                                      | 67 |
| <b>I-1.3. <i>Cleome arabica</i> L.</b> .....  | 68 |
| <b>I-1.4. <i>Lycium arabicum</i> Schweinf. ex-Boiss.</b> .....                          | 68 |
| <b>I-1.5. <i>Peganum harmala</i> Linn.</b> .....  | 69 |
| <b>I-1.6. <i>Thapsia garganica</i> L.</b> .....   | 69 |
| <b>I-1.7. <i>Thymelaea hirsuta</i> (L.) Endl.</b> .....                                 | 69 |
| <b>I-1.8. <i>Thymelaea microphylla</i> Coss. &amp; Dur.</b> .....                       | 71 |
| <b>I-2. Pois et pois chiche</b> .....   | 71 |
| <b>I-3. Matériel fongiques</b> .....  | 71 |
| <b>I-4. Milieux de culture</b> .....  | 72 |
| <b>Chapitre II : Techniques phytochimiques</b> .....                                    | 75 |
| <b>II-1. Obtention des extraits</b> .....   | 75 |
| <b>II-1-1. Préparation des plantes</b> .....  | 75 |
| <b>II-1-2. Extraction</b> .....   | 75 |
| <b>II-2. Rendement en extraits</b> .....  | 77 |
| <b>II-3. Fractionnement des extraits végétaux bruts</b> .....                           | 77 |
| <b>II-4. Tests phytochimiques</b> .....   | 79 |
| <b>II-4.1. Alcaloïdes</b> .....   | 79 |
| <b>II-4.2. Terpènes</b> .....   | 80 |
| <b>II-4.3. Stérols</b> .....  | 80 |
| <b>II-4.4. Flavonoïdes</b> .....  | 80 |
| <b>II-4.5. Autres composés phénoliques</b> .....  | 80 |
| <b>Chapitre III : Activité antifongique <i>in-vitro</i> des extraits végétaux</b> ..... | 81 |
| <b>III-1. Conduite des bioessais</b> .....  | 81 |
| <b>III-1.1. Bioessai aux extraits bruts</b> .....                                       | 81 |
| <b>III-1.2. Bioessai aux sous-fractions d'extraits</b> .....                            | 81 |
| <b>III-2. Effet des extraits végétaux sur la croissance mycélienne</b> .....            | 82 |
| <b>III-3. Effet des extraits végétaux sur la sporulation</b> .....                      | 83 |
| <b>III-4. Effet des extraits végétaux sur la germination des conidies</b> .....         | 83 |
| <b>Chapitre IV : Activité antifongique <i>in-vivo</i> des extraits végétaux</b> .....   | 85 |
| <b>IV-1. Principe des bioessais</b> .....   | 85 |
| <b>IV-2. Préparation des inocula</b> .....  | 85 |
| <b>IV-3. Préparation des plantes du pois et du pois chiche</b> .....                    | 86 |
| <b>IV-4. Inoculation</b> .....  | 87 |
| <b>IV-4.1. Sur pois chiche</b> .....  | 87 |

|  |    |
|--|----|
| <b>IV-4.2. Sur pois</b> .....  | 87 |
| <b>IV-5. Traitement aux extraits végétaux</b> .....                          | 89 |
| <b>IV-5.1. Phytotoxicité des extraits végétaux</b> .....                     | 89 |
| <b>IV-5.2. Bioessai sur pois chiche</b> .....                                | 89 |
| <b>IV-5.3. Bioessai sur pois</b> .....                                       | 90 |
| <b>IV-6. Effet des extraits végétaux sur la durée d'incubation</b> .....     | 90 |
| <b>IV-7. Effet des extraits végétaux sur la durée de latence</b> .....       | 90 |
| <b>IV-8. Effet des extraits végétaux sur la sévérité de la maladie</b> ..... | 91 |
| <b>IV-8.1. Sévérité de l'ascochytose sur pois chiche</b> .....               | 91 |
| <b>IV-8.2. Sévérité de l'ascochytose sur pois</b> .....                      | 91 |
| <b>Chapitre V : Traitement statistique des résultats</b> .....               | 94 |
| <b>V-1. Analyse de variance et comparaison des moyennes</b> .....            | 94 |
| <b>V-2. Dispositifs statistiques</b> .....                                   | 94 |

## Troisième partie : Résultats et Discussion

|   |     |
|---|-----|
| <b>Chapitre I : Phytochimie</b> .....   | 96  |
| <b>I-1. Rendement en extraits</b> .....   | 96  |
| <b>I-2. Screening phytochimique</b> .....   | 97  |
| <b>Chapitre II : Activité antifongique <i>in-vitro</i> des extraits végétaux</b> .....    | 99  |
| <b>II-1. Résultats</b> .....  | 99  |
| <b>II-1-1. Bioessais aux extraits végétaux bruts</b> .....                                | 99  |
| <b>II-1-1-1. Effet des extraits végétaux bruts sur la croissance mycélienne</b> .....     | 99  |
| <b>II-1-1-2. Effet des extraits végétaux bruts sur la sporulation</b> .....               | 102 |
| <b>II-1-1-3. Effet des extraits végétaux bruts sur la germination</b> .....               | 105 |
| <b>II-1-2. Bioessais aux sous-fractions d'extraits</b> .....                              | 108 |
| <b>II-1-2-1. Effet des sous-fractions d'extraits sur la croissance mycélienne</b> .....   | 108 |
| <b>II-1-2-2. Effet des sous-fractions d'extraits sur la sporulation</b> .....             | 110 |
| <b>II-1-2-3. Effet des sous-fractions d'extraits sur la germination</b> .....             | 111 |
| <b>II-2. Discussion</b> .....   | 113 |
| <b>II-3. Publication</b> .....  | 115 |
| <b>Chapitre III : Activité antifongique <i>in-vivo</i> des extraits végétaux</b> .....    | 122 |
| <b>III-1. Résultats</b> .....   | 122 |
| <b>III-1-1. Phytotoxicité des extraits végétaux</b> .....                                 | 122 |
| <b>III-1-2. Bioessai sur pois</b> .....   | 123 |
| <b>III-1-2-1. Effet des extraits bruts sur la durée d'incubation des pathogènes</b> ..... | 123 |
| <b>III-1-2-2. Effet des extraits bruts sur la durée de latence des pathogènes</b> .....   | 124 |
| <b>III-1-2-3. Effet des extraits bruts sur la sévérité de la maladie</b> .....            | 125 |
| <b>III-1-3. Bioessai sur pois chiche</b> .....  | 127 |
| <b>III-1-3-1. Effet des extraits bruts sur la durée d'incubation du pathogène</b> .....   | 127 |

|  |            |
|--|------------|
| <i>III-1-3-2. Effet des extraits bruts sur la durée de latence du pathogène.....</i> | <b>128</b> |
| <i>III-1-3-3. Effet des extraits bruts sur la sévérité de la maladie.....</i>        | <b>128</b> |
| <b>III-2. Discussion.....</b>  | <b>131</b> |
| <b>Conclusion générale et perspectives.....</b>                                      | <b>135</b> |
| <b>Références bibliographiques.....</b>  | <b>137</b> |
| <b>Annexes .....</b>   | <b>176</b> |

## Introduction générale

Depuis que l'homme est devenu agriculteur, il a toujours essayé de domestiquer le maximum d'animaux et de plantes (Purugganan & Fuller, 2009). Cette domestication a entraîné des modifications morphologiques et physiologiques chez les êtres vivants (Mannion, 1999). Concernant les plantes, l'homme a toujours préféré domestiquer celles qui produisent de grosses graines, même à petite quantité, vu qu'elles s'apprêtaient mieux à la récolte et au stockage que les plantes à petites graines. Le choix de l'homme de l'époque s'est orienté également vers les plantes à dominance apicale en écartant au maximum celles qui n'en avaient pas, pour causes les plantes à dominance apicale sont plus robustes que les autres, de plus les plantes au goût moins amère et moins astringent ont été aussi préférées à celles qui contiennent en excès des substances amères et astringentes, telles que les alcaloïdes et les composés phénoliques (Cook & Evans, 1983).

Au fil du temps, les pratiques de sélection ont affecté fortement la physiologie et la génétique des plantes en réduisant la variabilité au sein des populations et en augmentant la densité des plantes domestiquées, ce qui les a rendus plus vulnérables. Ces mêmes pratiques sont à l'origine de grandes perturbations des équilibres naturels des biotopes et des écosystèmes préexistants qui ont touché entre autres les agents pathogènes et leur interaction avec les plantes au point où ces dernières sont devenues très dépendantes de la protection de l'homme (Doebley & *al.*, 2006).

Tous les organismes vivants sont susceptibles d'être des proies d'agents pathogènes. L'interaction entre ces derniers et les plantes sont parmi les plus plurielles et les plus complexes. Le pathogène se développe en parasite au détriment de la plante pour accomplir son cycle de vie, ce qui se traduit souvent par une maladie qui peut conduire parfois à la mort de la plante hôte (Talbot, 2004). Cependant, certaines conditions favorisent d'avantage la propagation et l'implantation des agents phytopathogènes. C'est le cas de l'agriculture intensive qui crée des conditions favorables à leur prolifération.

Le FAO (Food and Agriculture Organisation ou Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture) estime que 20 à 25% des rendements agricoles potentiels sont perdus à cause des attaques de ravageurs et de maladies. Parmi les pathogènes responsables des maladies des plantes cultivées, plus de la moitié appartiennent au règne des *fungi* (Agrios, 2005) qui causent des pertes de rendements et de récoltes qui se comptent parmi les plus importantes. Ces pertes démontrent l'impact dramatique que peuvent provoquer les champignons phytopathogènes sur les cultures et

la disponibilité des denrées alimentaires (Dickinson, 2003). Le genre *Ascochyta*, parasite des légumineuses alimentaires, en est un exemple qui illustre cet impact.

Les légumineuses alimentaires, parmi lesquelles figurent le pois, la fève, le pois chiche, la lentille, le haricot, le soja, l'arachide, ...etc., font partie de la famille des *fabaceae*, plantes à fleurs mondialement distribuées. Elles succèdent les graminées (*Poaceae*) en importance agroéconomique en tant qu'aliments pour l'homme et en tant que fourrages pour les animaux d'élevage. Les graines de ces plantes sont une riche et accessible source de protéines et constituent une part très importante dans l'alimentation des populations croissantes des pays en voie de développement (Pande & *al.*, 2009). Comme cultures, les légumineuses jouent un rôle clé dans le maintien de la productivité des sols, notamment par leur capacité à assimiler l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>) leur procurant une valeur certaine dans les systèmes de production agricole partout où elles sont cultivées (Buddenhagen, 1988). Ces dernières années, leur utilisation a augmenté dans le monde entier en raison de leurs qualités nutritionnelles et de leurs utilisations industrielles (Jaiwal & Singh, 2003).

En Algérie, les légumineuses alimentaires occupent une place importante dans les systèmes de production et le calendrier agricole de plusieurs régions, car elles constituent pour la population une importante source d'alimentation. Leurs graines sont l'une des principales sources de protéines, particulièrement pour les ménages à faible bourse, vu que les protéines qu'elles contiennent restent plus accessibles que celles d'origine animale. L'amélioration de la production des légumineuses permet par ailleurs de réduire les importations et de limiter la dépendance économique vis-à-vis de l'étranger (Benbelkacem, 1988). Malgré cette importance, les rendements des cultures ont très peu progressé en comparaison avec les céréales.

Partout où la culture de légumineuses est pratiquée, elle ne va pas sans encombres et contraintes de différentes natures. Parmi les contraintes qui s'opposent à leur développement, il y a lieu de citer l'ascochytose, maladie à distribution mondiale que beaucoup de spécialistes considèrent comme la plus dévastatrice des cultures de légumineuses et économiquement la plus importante (Tivoli & *al.*, 2007 ; Rubiales & *al.*, 2018). L'ascochytose, anciennement connue sous le nom d'antracnose, est une maladie cryptogamique affectant les parties aériennes des plantes, elle est causée par un ensemble d'espèces de champignons appartenant au genre *Ascochyta*. Elle est responsable de grandes pertes de rendement (Rubiales & Fondevilla, 2012). Les attaques les plus sévères déprécient la qualité des récoltes, réduisent fortement les niveaux de production pouvant parfois aboutir à l'anéantissement total des cultures (Davidson & Kimber, 2007).

Les moyens de lutte contre l'ascochytose les plus pratiqués reposent essentiellement sur l'utilisation de produits chimiques de synthèse. Actuellement, ces produits connaissent de plus en plus des limites d'emploi du fait de leurs coûts élevés, de l'apparition de souches résistantes chez le parasite et à cause des conséquences néfastes sur la santé humaine et animale et sur l'environnement. Pour toutes ces raisons, la recherche de solutions alternatives à l'usage des pesticides synthétiques s'impose de jour en jour. A cet effet, des efforts substantiels sont consacrés au développement de nouvelles méthodes et stratégies de gestion de la maladie. L'intérêt porté aux produits naturels, visant à développer des biopesticides, prend progressivement de l'ampleur et ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour des moyens de lutte écoresponsables protecteurs de la santé humaine et animale. Les produits d'origine botanique attirent le plus d'attention, vu que les plantes, via leur métabolisme secondaire, offrent une gamme très diversifiée de substances bioactives dont les effets antimicrobiens sont souvent démontrés et largement reconnus. Un cas concret de la possibilité de valorisation des produits botaniques, le Neemazal<sup>®</sup> extrait du neem (*Azadirachta indica*), est utilisé actuellement en plein champ contre *Erysiphe pisi*, agent de l'oïdium du pois (Sahni & al., 2005 ; Singh & al., 2007).

Ce sujet nous a paru important à traiter, dans le cadre de travaux d'une thèse de doctorat, pour différentes raisons : (i) l'importance agroéconomique des légumineuses alimentaires en Algérie, (ii) leur état phytosanitaire qui se caractérise surtout par la prévalence de l'ascochytose comme maladie sévissant dans toutes les régions productrices, (iii) les moyens utilisés dans la lutte contre cette maladie qui restent pour la plupart des cas de nature chimique dont les méfaits ne sont plus à démontrer, (iv) la diversité floristique des steppes algériennes et du Hodna en particulier, qui peut être exploitée comme source de phytoconstitués susceptibles d'avoir une activité antifongique. Ce sont toutes ces raisons qui nous ont amenés dans le cadre de ce travail de thèse à réaliser un ensemble de bioessais testant *in-vitro* et *in-planta* l'effet anti-ascochyitique des extraits de *Artemisia alba* Turra., *Artemisia campestris* L., *Cleome arabica* L., *Lycium arabicum* Schweinf. ex-Boiss., *Peganum harmala* Linn., *Thapsia garganica* L., *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl., *Thymelaea microphylla* Coss & Dur., plantes poussant toutes spontanément dans la steppe du Hodna (Algérie). Les tests antiparasitaires sont menés sur l'ascochytose du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) et du pois (*Pisum sativum* L.). Par la même occasion, nous visons une valorisation des ressources phytogénétiques steppiques.

Ce document est agencé en trois parties distinctes : (i) la première partie est une revue bibliographique traitant le sujet des métabolites secondaires des végétaux et leur

utilisation dans la protection des plantes. Elle décrit aussi les dernières connaissances sur l'ascochytose des légumineuses alimentaires, en mettant l'accent sur le pois et le pois chiche, (ii) la deuxième partie est réservée à la description de la méthodologie et des techniques analytiques pratiquées dans l'ensemble des expérimentations, (iii) la troisième partie rapporte les résultats obtenus, leur interprétation et leur discussion.

Enfin, il y a lieu de signaler que ces dernières années, les phytopathologistes réservent le terme "anthracnose" aux maladies causées par *Colletotrichum sp.*, champignon dont l'appareil sporifère est un acervule. A la place de l'anthracnose on préfère le terme "ascochytose" dont l'agent causal est *Ascochyta sp.* qui produit des pycnides. Tout au long de ce document, il sera donc question d'ascochytose et non pas d'anthracnose.

# *Première partie* : **Revue Bibliographique**

*Chapitre I* : Utilisation des substances végétales dans la protection des plantes

*Chapitre II* : L'ascochytose des légumineuses alimentaires

## **Chapitre I: Utilisation des substances végétales dans la protection des plantes**

### **I-1. Introduction**

Le FAO (Food and Agriculture Organisation ou Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture) estime que 20 à 25% des rendements agricoles potentiels sont perdus à cause des attaques de ravageurs et des maladies. D'autres experts pensent que 20 à 60% de nos produits agricoles sont perdus chaque année dans les champs, après la récolte et pendant le transit et le stockage. Un tiers de la production agricole mondiale, évaluée à plusieurs milliards de dollars, est détruit chaque année dans les champs et les entrepôts par plus de 20 000 espèces de ravageurs et d'agents phytopathogènes. A ce titre, la protection des cultures et des récoltes joue un rôle extrêmement important dans l'augmentation des rendements agricoles et la préservation des stocks pour subvenir aux besoins alimentaires des populations, continuellement croissantes (Sergeeva, 2015).

Beaucoup de méthodes et de moyens de lutte sont utilisées dans la protection des cultures. Ces dernières années, les substances naturelles d'origine végétale surtout, sont de plus en plus étudiées et suscitent beaucoup d'intérêt, car il s'agit de composés bioactifs dont certains sont connus pour inhiber ou retarder la croissance des micro-organismes. La demande croissante actuelle en matière d'une alimentation saine et d'une agriculture durable et protectrice des écosystèmes et de la biodiversité, a entraîné une augmentation parallèle de l'intérêt pour l'utilisation des substances naturelles pour remplacer les pesticides chimiques conventionnels dans la lutte contre les ravageurs et les maladies des plantes cultivées (Copping & Duke, 2007 ; Dubey & *al.*, 2011 ; Sales & *al.*, 2016).

### **I-2. Historique**

Il y a environ 10 000 à 13 000 ans, l'homme a changé son mode de vie en passant de l'homme chasseur-cueilleur à celui d'agriculteur (Purugganan & Fuller, 2009). Un tel changement a eu de grandes conséquences avec des effets parfois dramatiques sur les animaux et les plantes que l'homme a domestiqués (Mannion, 1999). La domestication des plantes surtout, a entraîné des modifications morphologiques et physiologiques parfois néfastes à celles-ci (Salamini & *al.*, 2002). A titre d'exemple, les plantes moins amères, c'est-à-dire celles qui contenaient moins de substances amères telles que les alcaloïdes et les glycosides, ont été préférées à celles qui en contiennent davantage, alors que ces substances sont douées d'activité antimicrobienne largement reconnue

actuellement (Doebley & *al.*, 2006). Par ailleurs, la sélection a donné naissance à des spécimens de plantes à faible pool et variabilité génétiques comparativement aux types sauvages (Zhang & *al.*, 2002). Par conséquent, l'équilibre entre les plantes et leurs agents pathogènes s'est trouvé fortement perturbé et les plantes sont devenues plus vulnérables aux bioagresseurs et très dépendantes de la protection de l'agriculteur (Doebley & *al.*, 2006). Malgré l'absence de preuves, il est supposé que l'homme agriculteur est devenu agriculteur-protecteur en commençant à protéger ses cultures des parasites et des ravageurs, juste après le début de la domestication.

Historiquement, Il est difficile de déterminer avec précision où et quand des plantes ou des extraits de plantes ont été systématiquement utilisés en phytopharmacie ou plus généralement en agriculture (Sergeeva, 2015). Néanmoins, des écritures hiéroglyphes, chinoises, grecques, romaines et indiennes mentionnent que les plantes étaient utilisées avant tout autre pesticide, après que l'homme ait constaté que certaines plantes se protègent mieux que d'autres.

L'utilisation de l'arbre de neem (*Azadirachta indica* Juss ; *Meliaceae*) a été rapportée dans un ensemble de manuscrits écrits en sanskrit archaïque de 4000 ans d'âge (Koul & Walia, 2009). Les bienfaits des huiles essentielles végétales sont reconnus depuis des milliers d'années. Leur utilisation dans les rituels et dans la guérison des malades est décrite dans des manuscrits très anciens. Dès 2500 ans avant notre ère, des herbes et des huiles étaient utilisées pour protéger les semences et les grains stockés des attaques d'insectes. Le premier insecticide d'origine botanique remonte au XVII<sup>ème</sup> siècle, lorsqu'il a été démontré que la nicotine contenue dans les feuilles de tabac détruisait le doryphore. Le siècle suivant, certaines publications traitaient déjà des préparations à base de plantes pour lutter contre les insectes nuisibles aux plantes (Raja, 2014).

Avant la seconde guerre mondiale, plusieurs groupes de composés avaient commencé à être utilisés, il s'agissait surtout de la nicotine et les alcaloïdes du tabac (*Nicotiana tabacum*), de la roténone et les roténoïdes de *Lonchocarpus sp.*, du pyrèthre et des pyrèthrines du *Chrysanthemum cinerariifolium* et des huiles végétales. Néanmoins, l'utilisation de ces substances, en raison de leur toxicité vis-à-vis des espèces non ciblées, la nicotine surtout, ou de l'instabilité des molécules comme le pyrèthre, a diminué particulièrement suite à la mise au point et la commercialisation pendant la guerre de nouveaux produits plus efficaces, moins coûteux et faciles à utiliser tels que les organochlorés, les organophosphorés et les carbamates (Sergeeva, 2015).

Bien que des efforts substantiellement plus importants aient été consacrés au développement de nouveaux pesticides de synthèse, la recherche sur les substances naturelles, d'origine botanique entre autres, visant à développer des biopesticides, prend de plus en plus de l'ampleur, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour une protection des plantes cultivées écoresponsable et protectrice de la santé humaine et animale.

### **I-3. Métabolisme secondaire chez les végétaux**

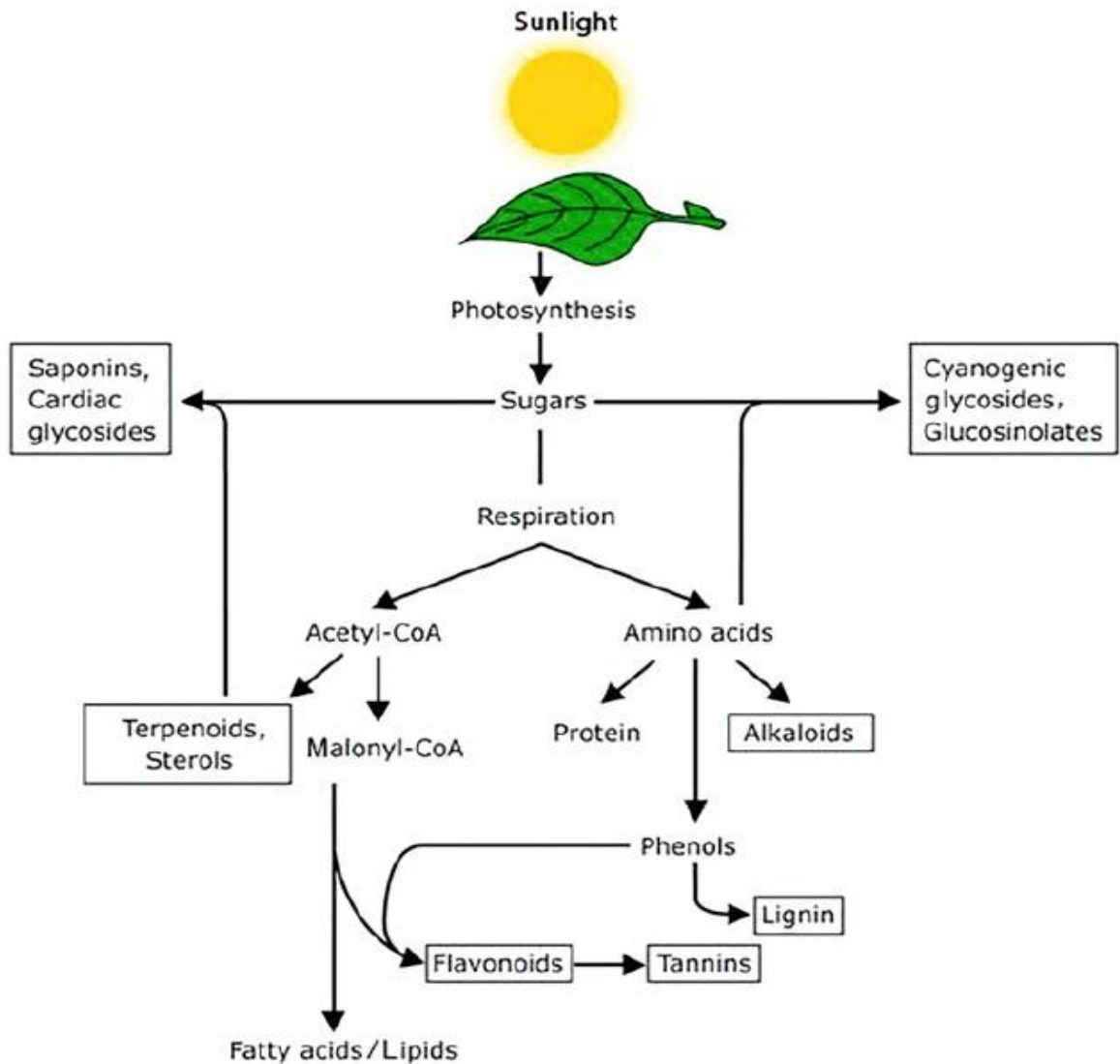
La biosynthèse chez le règne végétal donne naissance à une vaste gamme de métabolites organiques, dont un grand nombre contribuent à faire fonctionner les processus vitaux fondamentaux tels que la croissance, la division cellulaire, la respiration, la photosynthèse, la reproduction et l'accumulation des réserves. Ces métabolites sont appelés métabolites primaires. D'autres métabolites sont également synthétisés, mais ne jouent aucun rôle dans le métabolisme primaire. Ces composés remplissent des fonctions variées et sont collectivement appelés métabolites secondaires. Au niveau biosynthétique, les deux catégories de composés sont synthétisées à partir des mêmes voies métaboliques fondamentales (Figure 01) et partagent de nombreux intermédiaires (Ghorbanpour & *al.*, 2017 ; Bhatla, 2018).

Pendant de nombreuses années, la signification des métabolites secondaires n'était pas bien comprise et on pensait qu'ils s'agissaient de simples déchets métaboliques ou des intermédiaires sans fonction ou des produits finaux du métabolisme primaire. Au XIX<sup>ème</sup> siècle, des recherches initiées par des chimistes organiques, ont révélé l'importance des métabolites secondaires dans la pharmacologie (découverte de l'aspirine ou l'acétylsalicylate), en tant que composés de défense des plantes (phytoalexines), rôle dans la restriction de la germination et la croissance d'autres plantes en croissance (allélopathie), protection contre les rayons UV, ...etc. Ces métabolites contribuent donc à l'adaptation des plantes à leur environnement (Cragg & *al.*, 2012 ; Nascimento & Fetto-Neto, 2016, Bhatla, 2018 ; Devi & *al.*, 2017).

Un métabolite secondaire est une molécule qui, par exclusion, n'appartient pas au métabolisme primaire. Il s'agit de molécules organiques non directement impliquées dans le développement ou la reproduction d'un organisme et leur absence n'entraîne pas une mort immédiate mais peut limiter la survie. Les métabolites secondaires sont également appelés produits secondaires, métabolites spécialisés ou produits naturels. (Luckner, 1984 ; Koul & Dhaliwal, 2001 ; Macheix & *al.*, 2005 ; Sarker & *al.*, 2006).

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés (alcaloïdes, terpènes, composés phénoliques...etc.). Ces espèces chimiques sont très

inégalement réparties chez les végétaux mais dont le niveau d'accumulation peut quelques fois atteindre des valeurs élevées (Stalikas, 2010). Trois principales caractéristiques différentient les métabolites secondaires des métabolites primaires : (i) une difficulté d'attribuer à ces métabolites une fonction bien déterminée dans la physiologie de la plante, (ii) une répartition inégale entre des espèces végétales très voisines ou même entre sous-espèces ou variétés de la même espèce, (iii) une certaine inertie biochimique, vu que ces substances sont rarement remobilisées dans la plante après qu'elles y ont été accumulées (Macheix & *al.*, 2005).



**Figure 01** : Représentation simplifiée des interconnexions entre les principales voies métaboliques primaires et secondaires, les métabolites secondaires sont encadrés. Bhatla (2018).

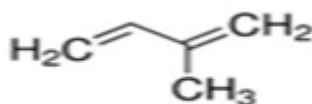
On estime à plusieurs centaines de milliers les métabolites secondaires, de structure et de fonction très diverses. Ils sont classés de différentes manières, notamment en fonction de leur structure chimique (présence d'une structure cyclique), de leur composition (azote, sucre, etc.), de leur solubilité dans divers solvants ou suivant la voie métabolique via laquelle ils sont synthétisés. L'ensemble des spécialistes s'accordent à

classer les métabolites secondaires des plantes en trois principaux groupes (Macheix & *al.*, 2005 ; Sarker & *al.*, 2006 ; Jeyasankar & *al.*, 2014 ; Miresmailli & Isman, 2014 ; Sergeeva, 2015).

- Terpènes ou terpénoïdes (monoterpènes, sesquiterpènes, limonoïdes, pigments, huiles essentielles, stéroïdes) ;
- Composés phénoliques (phénols simples, coumarines, flavonoïdes, lignine, tanins) ;
- Composés contenant de l'azote tels que les alcaloïdes, les glycosides (saponines, glycosides cyanogènes), les glucosinolates et les  $\alpha$ -aminoacides non protéogènes.

### I-3-1. Terpènes

Les terpènes constituent la classe de métabolites secondaires la plus vaste et la plus diversifiée, avec plus de 25 000 composés. Ils se caractérisent souvent par leur forte odeur et leur nature volatile. Chimiquement, les terpènes de formule brute  $(C_5H_8)_n$ , sont des produits lipophiles formés d'unité de base dite isoprène de formule  $C_5H_8$  (Figure 02). C'est la condensation d'unités isoprène qui conduit aux différents terpènes et lorsque les terpènes contiennent des fonctions chimiques comme un hydroxyle, un carbonyle, une cétone ou un aldéhyde, ils sont dits terpénoïdes ou isoprenoïdes (Luckner, 1984 ; Sarker & *al.*, 2006).



**Figure 02 :** Unité d'isoprène (2-Méthyl-1,3-butadiène). Bhatla (2018).

Les terpènes et les terpénoïdes sont produits par diverses plantes, principalement des conifères, des agrumes et des eucalyptus. Leur forte odeur et leur nature hydrophobe aident les plantes à se protéger contre les parasites, les insectes phytophages et les herbivores. C'est le cas surtout du menthol dans les feuilles de *Mentha*, des cannabinoïdes dans le cannabis, de l'azadirachtine dans le neem (*Azadirachta indica*). Ils sont des composants de base des huiles essentielles pour lesquelles l'activité antimicrobienne est largement reconnue. Par ailleurs, ces substances remplissent également d'autres fonctions biologiques, ils interviennent notamment dans les arômes et les saveurs de girofle (*Zyzygium aromaticum*), de cannelle (*Cinnamomum verum*), de gingembre (*Zingiber officinale*) et dans la pigmentation chez le tournesol (*Helianthus annuus*) et la tomate (*Solanum lycopersicum*). Chez les gymnospermes, tels que les conifères, ils inhibent les attaques d'agents pathogènes et ils interviennent comme répulsifs d'herbivores et

d'insectes (Isman & *al.*, 1996 ; Nagegowda & Dudareva, 2007 ; Regnault-Roger & Philogène, 2008 ; Pretorius & Van Der Watt, 2011).

Une multitude de travaux se sont intéressés à l'étude de la bioactivité des terpènes, des terpénoïdes et des huiles essentielles à l'égard de plusieurs agents phytopathogènes. Dans beaucoup de cas, ces travaux révèlent une activité antifongique potentiellement exploitable dans le contrôle des maladies des plantes cultivées (Sheetal & Singh, 2008 ; Kusumoto & *al.*, 2014 ; Sergeeva, 2015).

Selon Madar et *al.* (1995), le Cupressotropolone A et B, deux terpénoïdes isolés de l'écorce du cyprès d'Italie (*Cupressus sempervirens* L.) étaient efficaces à des doses de 3,3 et 3,7 µg respectivement, pour réduire de moitié les taux de germination des spores de *Alternaria alternata* et de *Verticillium dahliae*. Rasoamiaranjanahary et *al.* (2003), rapportent des effets inhibiteurs très notables de la croissance de *Cladosporium cucumerinum*, agent de la gale des cucurbitacées, lorsqu'il est cultivé sur des milieux contenant du Fusicoserpenol A (Fusicoccane) et de l'acide dolabeserpenoïque A (Dolabellane), deux diterpènes isolés des feuilles de *Hypoestes serpens* (Vahl) R. Br. (*Acanthaceae*). Baraza et *al.* (2008) ont également observé les mêmes effets sur le même champignon d'un autre diterpène dit Hugorosenone et qu'ils l'ont obtenu à partir de l'écorce des racines de *Hugonia castaneifolia* Engl.

Le Trianthenol, un tetraterpénoïde purifié à partir d'un extrait chloroformique de *Trianthema portulacastrum* Linn. (*Aizoaceae*), exerce également une activité antifongique à l'égard de plusieurs champignons phytopathogènes. Nawaz et *al.* (2001), ont révélé que ce tetraterpénoïde inhibe la croissance de *Fusarium solani* var. *lycopersici*, agent du flétrissement fusarien de la tomate, de *Macrophomina phaseolina*, champignons tellurique responsable de l'altération et de la pourriture du collet et des racines de plusieurs plantes cultivées et de *Rhizoctonia solani*, agent du rhizoctone brun de la pomme de terre. A cet effet, les taux d'inhibition enregistrés étaient respectivement de 58,3, 40 et 69,5%.

Une étude menée par Sirirat et *al.* (2009), a montré que l'huile de cannelle (écorce de cannelier, *Laurus cinnamomum* L.) exerce de puissants effets inhibiteurs sur *Botrytis cinerea* en stoppant complètement sa croissance mycélienne. Dans le même sillage, d'autres chercheurs rapportent qu'une multitude d'huiles essentielles de plantes, telles que l'huile de citronnelle (*Cymbopogon* spp.), l'huile du basilic (*Ocimum basilicum*), l'huile d'orange (*Citrus sinensis*), l'huile de citron (*Citrus Medica limonum*) et l'huile de moutarde (*Brassica juncea*), pouvaient réduire considérablement l'antracnose et les pertes post-récolte induites par *Colletotrichum gloeosporioides* dans les manguiers (Salomone & *al.*, 2008 ; Abd-Alla & Haggag, 2013 ; Masangwa & *al.*, 2013).

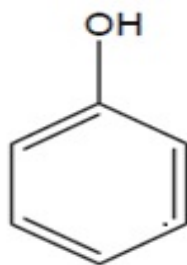
D'après Rao et *al.* (2010), la nature lipophile des terpènes, des terpénoïdes et des huiles essentielles serait à l'origine de leur mode d'action. Cette lipophilicité, qui leur permette de s'interférer dans les membranes cellulaires, perturbe les échanges transmembranaires, particulièrement celles des ions. En ce qui concerne les huiles essentielles, leur mode d'action conjugue une action fongitoxique directe, en inhibant la croissance mycélienne et de la germination des spores, à une action d'activation des mécanismes de défense de la plante en jouant le rôle d'inducteur ou d'éliciteur de la synthèse des phytoalexines et des PR-*Proteins* ou PRP (*Pathogenesis Related Proteins*) liées à la résistance (Stangarlin & *al.* 1999). En outre, le spectre d'action des terpènes et des terpénoïdes ne se limite pas qu'aux champignons, cependant, selon Gurjar et *al.* (2012), ils peuvent exercer également une action antibactérienne, antivirale et insecticide (Tableau 01).

**Tableau 01** : Spectre d'action de quelques terpénoïdes. Adapté de Gurjar & *al.* (2012).

| Plante source (famille)                       | Nom Scientifique                   | Composé           | Spectre d'action                         |
|---|------------------------------------|-------------------|--|
| Le Bael ( <i>Rutaceae</i> )                   | <i>Aegle marmelos</i> Linn.        | Huile essentielle | Antifongique, antivirale                 |
| Le curcuma ( <i>Zingiberaceae</i> )           | <i>Curcuma longa</i> Linn.         | Curcumine         | Antifongique, antibactérien              |
| Le neem ou le margousier ( <i>Meliaceae</i> ) | <i>Azadirachta indica</i> A. Juss. | Azadirachtine     | Antifongique, antibactérien, insecticide |

### I-3-2. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des composés qui possèdent un ou plusieurs groupes hydroxyle liés directement à un cycle aromatique (benzène). Le phénol (Figure 03) est la structure sur laquelle repose tout le groupe des ces composés (Vermerris & Nicholson, 2006).



**Figure 03** : Le cycle phénol. Vermerris & Nicholson (2006).

Les polyphénols sont des composés qui ont plus d'un groupe hydroxyle phénolique attaché à un ou plusieurs cycles benzéniques (non pas des polymères de molécules de phénol individuelles). Les composés phénoliques sont caractéristiques des plantes, c'est à dire qu'ils sont des substances typiquement végétales. Comme groupe, ils se trouvent généralement sous forme d'esters ou de glycosides plutôt que sous forme de composés libres. A l'image des autres métabolites secondaires, les composés phénoliques ont une répartition inégale chez les différentes espèces végétales et parfois pour une même espèce. Les variations sont aussi considérables suivant les tissus et les cellules (Fleuriet & Macheix, 2003)

Plusieurs milliers de composés phénoliques, très diversifiés, ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui. Ils peuvent être regroupés en de nombreuses classes (Tableau 02) qui se différencient par : (i) la complexité de l'édifice de base qui peut aller d'une simple molécule à 6 carbones aux molécules très polymérisées, (ii) le degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation, (iii) la possibilité de ponter des liaisons avec d'autres molécules telles que des glucides, des lipides, des protéines et des métabolites secondaires autres que les composés phénoliques (Macheix & *al.*, 2005 ; Talapatra & Talapatra, 2015).

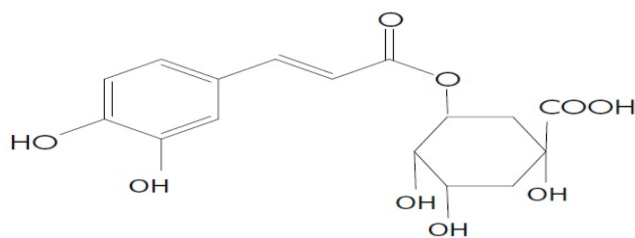
Biologiquement, les composés phénoliques agissent en tant qu'éléments protecteur de la plante contre les agressions d'agents pathogènes et d'insectes nuisibles (Harborne & Williams, 2000). A ce terme, il faut différencier entre les composés qui sont présents avant l'agression et ceux qui sont synthétisés en réponse à celle-ci. Lorsque des composés sont présents avant l'infection, ils sont classés en tant que métabolites antimicrobiens préformés ou phytoanticipines et font partie des mécanismes de résistance passive, en revanche, s'ils sont synthétisés après, ils sont classés comme phytoalexines et font partie dans ce cas des mécanismes de résistance active (Van Etten & *al.*, 1994).

Les composés phénoliques interviennent dans la réponse et les mécanismes de défense des végétaux contre les agressions biotiques, soit en tant que barrière mécanique dans le cas de la lignine, soit encore comme barrière chimique en agissant comme antibiotiques ou antifongiques. Cette bioactivité peut résulter de la capacité des phénols ou des quinones qui en découle par oxydation à se lier aux protéines et bloquer ainsi les enzymes microbiennes impliquées dans les processus infectieux (Macheix & *al.*, 2005). Ce mode d'action explique en partie le rôle que joue ces métabolites dans la résistance à la pénétration et à la progression des pathogènes suite à leur accumulation au niveau du site d'infection (Mellersh & Heath, 2004).

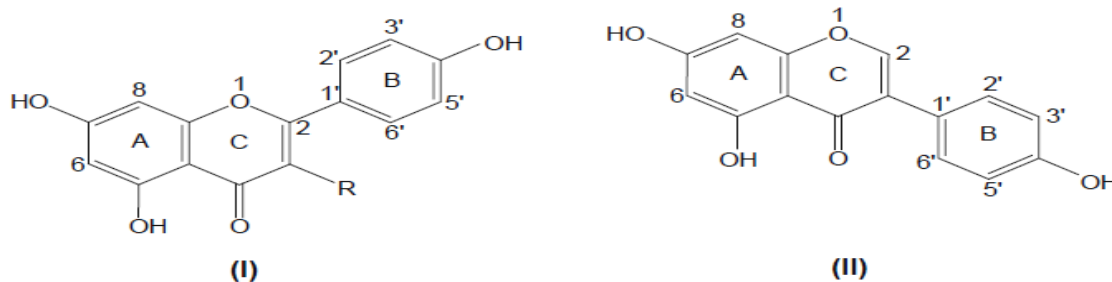
Trois groupes de composés phénoliques sont impliqués dans la réaction des plantes aux attaques d'agents pathogènes, l'acide salicylique et l'acide jasmonique, comme molécules signaux dans l'induction (élicitation) des PR-*Proteins*, les composés phénylpropanoïdes (phénoliques et phytoalexines) et la lignine et les polyphénols apparentés (Bennett & Wallsgrove, 1994 ; Ruiz & Romero, 2001 ; Smith & *al.*, 2009).

**Tableau 02** : les principales classes de composés phénoliques. Adapté de Macheix & *al.* (2005).

| Squelette carboné | Classe  | Exemple   | Origine (exemple)   |
|-------------------|---|---|---|
| $C_6$             | Phénols simples   | Catéchol  |   |
| $C_6-C_1$         | Acides hydroxybenzoïques  | <i>p</i> -hydroxybenzoïque  | Epices, Fraise  |
| $C_6-C_3$         | Acides hydroxycinnamiques (Fig. 04)   | Acides caféique, férulique  | Pomme de terre, Pomme                                       |
|                   | Coumarines  | Scopolétine, Esculétine   | Citrus  |
| $C_6-C_4$         | Naphtoquinones  | Juglone   | Noix  |
| $C_6-C_2-C_6$     | Stilbènes   | Resvératol  | Vigne   |
| $C_6-C_3-C_6$     | Flavonoïdes (Fig. 05, I)<br>Flavonols<br>Anthocyanes<br>Flavanols<br>Flavanones | Kaempférol, Quercétine<br>Cyanidine, Pélargonidine<br>Cathéchine,<br>Epicathéchine<br>Naringénine | Fruits, légumes<br>Fruits rouges<br>Pomme, raisin<br>Citrus |
|                   | Isoflavonoïdes (Fig. 05, II)  | Daidzéine   | Soja, pois  |
| $(C_6-C_3)_2$     | Lignanes  | Pinorésinol   | Pin   |
| $(C_6-C_3)_n$     | Lignines  | //  | Bois, Noyau de fruits                                       |
| $(C_{15})_n$      | Tannins   | //  | Raisin rouge  |



**Figure 04** : L'acide chlorogénique. Stalikas (2010).



**Figure 05** : Structure de base des (I) flavonoïdes (R = OH: flavonols, R = H: flavones) et (II) isoflavones. Stalikas (2010).

Harborne et Williams (2000) et Vermerris et Nicholson (2006), rapportent que l'implication des composés phénoliques dans la résistance des plantes aux agents pathogènes recouvre trois aspects complémentaires : (i) l'existence de barrières phénoliques constitutives, préexistant à l'infection et qui peuvent en limiter les effets, (ii) la stimulation de la biosynthèse de phénols déjà existants avant l'infection ce qui les accumule d'avantage, (iii) la biosynthèse de phytoalexines, de nature phénolique parmi d'autres, qui n'existaient pas dans la plante avant l'infection. Ces dernières résultent de l'expression de gènes du métabolisme secondaire suite à l'interaction hôte-pathogène. La diversité des composés phénoliques ainsi que leur rôle dans les systèmes de défense des plantes, ont incité les chercheurs à lancer des travaux qui butent sur l'identification et la caractérisation de nouvelles molécules douées d'activité biologique.

Dans ce sens, Svetaz et *al.* (2004) ont noté une intéressante activité antifongique d'une flavanone (7-hydroxyflavanone) et d'un ester de l'acide caféique (1-méthyl-3-(4'-hydroxyphényl)-propyl caffeate), purifiés à partir d'un extrait méthanolique de *Zuccagnia punctata* Cav. (*Fabaceae*), contre plusieurs champignons phytopathogènes économiquement importants, à savoir *Phomopsis longicolla*, et *Colletotrichum truncatum* agents de la pourriture des graines et de l'anthracnose du soja respectivement, *Sclerotium bataticola*, agent de la pourriture charbonneuse du tournesol, *Alternaria alternata*, agent de l'alternariose des solanacées et *Fusarium graminearum*, agent de la fusariose des épis du maïs.

Lee et al. (2004), ont isolé d'un extrait de *Acorus gramineus* (graminée) un phénylpropanoïde qu'ils l'ont identifié comme étant la  $\beta$ -Asarone (cis-2,4,5-triméthoxy-1-propénylbenzène) et pour lequel ils attribuent une forte activité antifongique et antibactérienne. En effet, la  $\beta$ -Asarone, appliquée *in-vitro* à des doses allant de 0,5 à 30  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , inhibe complètement la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes, *Cladosporium cucumerinum*, *Colletotrichum orbiculare*, *Magnaporthe grisea* et *Pythium ultimum*. La même étude rapporte qu'un traitement *in-vivo* à la  $\beta$ -Asarone des feuilles de concombre à une dose de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , inoculées préalablement par *Colletotrichum orbiculare*, inhibe également la formation de lésions sur ces feuilles. La même substance présente aussi une activité antibiotique appréciable à l'égard des bactéries phytopathogènes, *Erwinia carotovora subsp. carotovora*, *Ralstonia solanacearum* et *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*.

Quant aux flavonoïdes, Roy et Chatterjee (2010), rapportent qu'une flavone, identifiée comme étant la 5-hydroxy flavone et extraite des feuilles de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (*Apocynaceae*) exerce une activité antifongique notable contre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* et *Alternaria alternata*, trois agents phytopathogènes. Alcerito & al. (2002), décrivent par ailleurs, une activité antifongique contre *Cladosporium sphaerospermum*, champignon responsable des pertes post-récoltes des fruits et légumes, de trois flavonoïdes extraits des feuilles de *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bur. (*Bignoniaceae*), il s'agit du Cirsiliol, de la Cirsimaritine et de la Hispiduline.

### **I-3-3. Composés contenant de l'azote**

Cette catégorie de métabolites secondaires comprend les alcaloïdes, les glycosides (saponines, glycosides cyanogènes), les glucosinolates et certains  $\alpha$ -aminoacides non protéogènes. La plupart des produits, contenant de l'azote, sont principalement synthétisés à partir d' $\alpha$ -aminoacides courants ( $\alpha$ -aminoacides protéogènes), tels que la lysine, la tyrosine et le tryptophane. Un certain nombre de ces métabolites ont une importance significative en raison de leur bioactivité (Nascimento & Fett-Neto, 2016).

#### ***I-3-3-1. Alcaloïdes***

Les alcaloïdes constituent un vaste groupe de biomolécules diverses comprenant plus de 15 000 composés. Comme leur nom l'indique, la plupart des alcaloïdes sont de nature alcaline, mais certains sont neutres. Ils ont tous au moins un atome d'azote dans leur structure, généralement en tant que partie d'un hétérocycle (Bennett & Wallsgrove, 1994 ; Talapatre & Talapatra, 2015). Les alcaloïdes sont presque

présents dans tout le règne végétal, principalement dans les angiospermes. Les *Magnoliaceae*, les *Solanaceae*, les *Papaveraceae*, les *Fabaceae*, les *Rubiaceae*, les *Apocynaceae* et les *Ranunculaceae* font partie des familles de plantes importantes produisant des alcaloïdes. Le premier alcaloïde à avoir été isolé et caractérisé à partir des plantes était la morphine du *Papaver somniferum* ou pavot à opium (Bennett & Wallsgrove, 1994 ; Farkas, 2015).

D'après Bhatla (2018), les alcaloïdes jouent plusieurs rôles physiologiques chez les végétaux. Toutefois leurs principales fonctions sont les suivantes :

- Ils agissent comme composés de défense et offrent une protection contre les agents pathogènes et les prédateurs en raison de leur toxicité et de leur amertume.
- Ils peuvent agir en tant que réserves mobilisables d'azote, permettant de libérer de l'azote en cas de carence.
- Ils peuvent agir en tant que régulateurs de croissance, en particulier en tant qu'inhibiteurs de la germination.
- Ils peuvent aider à maintenir l'équilibre ionique grâce à leur pouvoir chélateur.
- Ils peuvent fonctionner comme agents de détoxification en séquestrant des composés nocifs ou toxiques via la méthylation, la condensation et la cyclisation.

S'intéressant à leur action comme composés intervenant dans la défense des plantes, plusieurs travaux consacrés à l'étude de ce type d'action, rapportent qu'un grand nombre d'alcaloïdes sont bioactifs et potentiellement antimicrobiens contre un grand nombre de pathogènes (Osbourn, 1996 ; Dzoyem & Kuete, 2013).

L'Allosécurinine, un alcaloïde extrait de *Phyllanthus amarus* Linn. (*Euphorbiaceae*), selon Singh et al. (2007) inhibe fortement la germination des spores de *Alternaria alternata*, *A. solani*, *A. brassicicola*, *A. brassicae*, *Curvularia lunata*, *C. pallescens*, *C. maculans*, *Colletotrichum musae*, *C. gloeosporioides*, *Erysiphe pisi*, *Fusarium udum*, *Helminthosporium echinoclova*, *H. penniseti*, *H. spiciferum* et *Heterosporium sp.*. Dans la même étude, il a été observé également qu'avec une concentration de 200ppm, considérée comme très faible comparativement à 1000ppm, *Curvularia sp.*, *Collectotrichum sp.* et *Heterosporium sp.* présentaient le plus de sensibilité à cet alcaloïde, dans la mesure où la germination des spores est complètement inhibée.

D'autres essais réalisés par Oros et Ujváry (1999) consacrés à l'étude des effets antifongiques et antibactériens d'une poudre, préparée à partir des graines de *Schoenocaulon officinale* A. Grey (*Melanthiaceae*), autrefois utilisée comme insecticide botanique sélectif contre les thrips (thysanoptères). Les principes actifs de cet insecticide sont constitués de la Cévacine, de la Cévadine, de la 3-*O*-Vanilloylvéracévine et de la Vératridine, toutes sont

des dérivés esters de l'alcaloïde stéroïdien Véracévine et appartiennent au groupe Ceveratrum, alcaloïdes du genre *Veratrum*.

L'étude a concerné une large gamme de bactéries et de champignons phytopathogènes. A l'issue de ces essais, les auteurs rapportent que 10 $\mu$ mol des alcaloïdes testés *in-vitro* avaient des effets très restrictifs de la croissance des bactéries appartenant aux genres *Erwinia* et *Corynebacterium*, il en était de même pour les champignons *Fusarium graminearum*, *Glomerella cingulata* et *Colletotrichum coccodes*, avec une forte activité antifongique à une dose de 1 $\mu$ mol.

Pareillement, des tests *in-vivo* des mêmes alcaloïdes contre *Erysiphe graminis f. sp. tritici*, agent de l'oïdium du blé et *Plasmopara halstedii*, agent du mildiou du tournesol, révèlent qu'une pulvérisation des plantes, inoculées préalablement, avec une solution à 50  $\mu$ mol réduit considérablement les symptômes et la formation des propagules reproductives induisant ainsi une perturbation des cycles épidémiques des deux pathogènes. L'activité antimicrobienne de ce groupe d'alcaloïdes serait, d'après les mêmes auteurs, liée à leur action sur les échanges membranaires des cellules microbiennes, en particulier sur la pompe de sodium.

### ***I-3-3-2. Glycosides et glucosinolates***

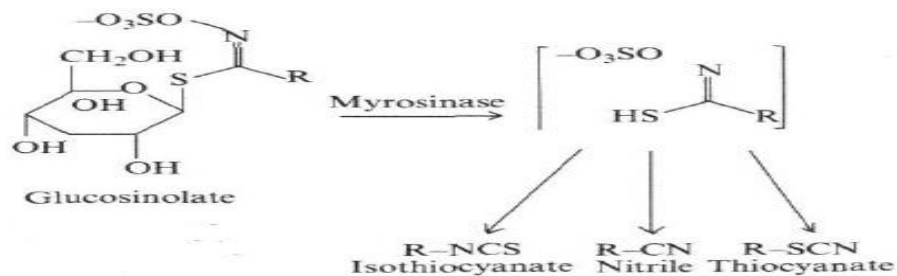
Les Glycosides et les glucosinolates représentent deux autres classes de métabolites secondaires contenant de l'azote, il s'agit de composés largement répandus chez le règne végétal. Les glycosides, réparties généralement en saponines et glycosides cyanogènes, sont des substances formées de la liaison condensatrice entre une fraction glucidique ou glycone et des molécules non glucidiques qui peuvent être des  $\alpha$ -aminoacides ou des stéroïdes et qui forment la fraction non glucidique ou aglycone (génine). La liaison entre les deux fractions étant une liaison glycosidique.

Métaboliquement, les glycosides sont dérivés d'autres métabolites secondaires par l'addition de la fraction glucidique, addition catalysée par des glycosyltransférases. Le glucide le plus couramment additionné est le glucose, mais il peut s'agir aussi de di-, tri- ou tétrasaccharide, de plus des modifications fréquentes des fragments de sucre, telles que l'acylation et l'oxydation, s'ajoutent aux variations existant au sein des glycosides (Dubey & *al.*, 2011).

Les glucosinolates sont des glycosides contenant du soufre. Ils sont présents dans les plantes au goût et aux arômes piquants, spécialement les *Brassicaceae* ou crucifères pour lesquelles ce type de métabolites constitue l'une de leurs caractéristiques. Les glucosinolates sont également connus sous le nom de thioglycosides ou glycosides d'huile

de moutarde, ils se décomposent pour libérer des isothiocyanates qui agissent comme des substances défensives (Figure 06). Du point de vu chimique, Les glucosinolates sont formés de trois structures différentes : une fraction  $\beta$ -thioglucose, une fraction oxime sulfonate et une chaîne latérale variable dérivée d' $\alpha$ -aminoacides aliphatiques, aromatiques ou indoliques (Ishida & *al.*, 2014). Il existe trois types différents de glucosinolates en fonction de la nature des acides aminés : les glucosinolates aliphatiques dérivés de leucine, de valine, de méthionine, d'isoleucine et d'alanine; les glucosinolates d'indole, dérivés du tryptophane et les glucosinolates aromatiques dérivés de la phénylalanine ou de la tyrosine (Bennett & Wallsgrove, 1994).

Lorsque les plantes sont intactes, les glycosides cyanogènes et les glucosinolates (localisés dans la vacuole des cellules) sont séparés de leurs enzymes hydrolytiques et donc ne subissent pas de décomposition. En cas d'attaque parasitaire ou de blessures physiques, substrats et enzymes se trouvent alors en contact et des réactions de dégradation de ces composés se déclenchent (Figure 06). En effet, La dégradation a lieu sous l'action d'une enzyme appelée myrosinase, une  $\beta$ -thioglucosidase libérant ainsi des produits chimiquement différents et bioactifs dans les réactions de défense des plantes, tels que les isothiocyanates, les nitriles, et les thiocyanates (Sánchez-Pujante & *al.* 2017).



**Figure 06 :** Structure, hydrolyse et produits d'hydrolyse des glucosinolates. Bennett & Wallsgrove (1994).

Les glycosides et les glucosinolates sont connus pour être impliqués dans la réponse des plantes aux stress abiotiques, salinité surtout (Bennett & Wallsgrove, 1994), mais ils sont aussi connus pour leur implication dans les stress biotiques, ils sont très toxiques aux herbivores une fois pris en excès et ils sont très connus pour leur action insecticide. D'autre part, les glucosinolates, les glycosides cyanogènes et leur produits de dégradation, isothiocyanates surtout, possèdent également des activités antibactériennes et antifongiques (Bennett & Wallsgrove, 1994 ; Jang & *al.*, 2010 ; Ishida & *al.*, 2014 ; Sánchez-Pujante & *al.*, 2017).

Abbassy et *al.* (2007), ont isolé deux glycosides à partir des graines de *Simmondsia chinensis* (Link) Schneider (*Simmondsiaceae*) ou jojoba. Ils les identifient comme

étant le Simmondsine et le Simmondsine 2'-ferulate. En plus d'une action insecticide, les deux glycosides présentent également une activité fongicide comparable à un fongicide conventionnel à l'égard de quatre champignons phytopathogènes à savoir *Rhizoctonia solani*, *Pythium debaryanum*, *Botrytis fabae* et *Fusarium oxysporum*. Au même titre, Aires et al. (2009), en étudiant l'effet antibactérien des produits d'hydrolyse des glucosinolates, rapportent que des isothiocyanates représentés par le Benzylisothiocyanate, le 2-Phenylethylisothiocyanate et le Sulforaphane sont des produits phytochimiques potentiellement aptes à se substituer aux bactéricides de synthèse dans la mesure où ils ont montré une action fortement inhibitrice de la croissance de *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas cichorii*, *P. tomato*, *Xanthomonas campestris* et de *X. juglandis*, toutes des bactéries phytopathogènes.

#### I-4. Conclusion

L'importance des plantes supérieures comme source de substances bioactives, réside dans leur capacité de synthèse d'une large gamme de métabolites secondaires pour lesquelles une activité biologique très diversifiée est largement reconnue (Wedge & Smith, 2006 ; Copping & Duke, 2007 ; Springob & Kutchan, 2009). Les végétaux sont également reconnus pour être les producteurs les plus efficaces de différents composés biologiquement actifs. Ils mobilisent ces composés dans leur interaction avec leur environnement. Cette interaction se manifeste dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques, en particulier dans leur résistance aux bioagresseurs (Dubey & al., 2011 ; Gurjar & al., 2012).

En revanche, et comme il a été déjà signalé, la sélection a fait que les plantes cultivées ont des niveaux de biosynthèse de ce type de composés moins importants comparativement à leurs ancêtres sauvages (Salamini & al., 2002 ; Doebley & al., 2006). De nombreuses espèces cultivées du genre *Brassica* à saveur plus douce, par exemple, accumulent moins de glucosinolates, par conséquent, elles sont plus vulnérables et plus fréquemment infectés par le mildiou, contrairement aux espèces sauvage apparentées à forte teneur en glucosinolates (Luckner, 1984).

L'ensemble des travaux réalisés sur l'activité biologique des produits phytochimiques, révèlent souvent leur efficacité comme substances antimicrobiennes. L'action bioactive ciblée, la biodégradabilité et la disponibilité de ces produits, leur

procure tout l'intérêt pour être intégrés dans les stratégies de lutte comme substituants aux pesticides chimiques (Pandey & *al.*, 2002). Le Neemazal<sup>®</sup>, un produit extrait du neem (*Azadirachta indica*), est utilisé en plein champ avec succès contre l'oïdium du pois (*Erysiphe pisi*), constitue déjà un exemple concret de la possibilité de valorisation des produits botaniques dans la protection des plantes (Sahni & *al.*, 2005 ; Singh & *al.* 2007).

## Chapitre II : L'ascochytose des légumineuses alimentaires

### II-1. Les légumineuses alimentaires

#### II-1-1. Introduction

Les légumineuses sont une famille de plantes à fleurs mondialement distribuées et qui succèdent les graminées (*Poaceae*) en importance et en tant qu'aliments pour l'homme comme légumes secs et pour les animaux en tant que fourrages. Les graines de ces plantes sont une riche et accessible source de protéines et constituent une part très importante dans l'alimentation des populations croissantes des pays en voie de développement (Pande & *al.*, 2009). Anciennement, toutes les civilisations issues du développement agricole avaient choisi au moins une légumineuse en plus d'une céréale pour leur alimentation, soja et riz en Asie, lentilles et orge ou blé au Moyen-Orient, haricot et maïs en Amérique (Smartt, 1996).

Les légumineuses regroupent des plantes ornementales telle que le pois de senteur (*Lathyrus odoratus* L.), fourragères comme le trèfle (*Trifolium repens* L.) et bien sûr alimentaires. Selon leur utilisation, ces dernières se répartissent en trois groupes : (i) les légumes secs qui regroupent essentiellement les lentilles (*Lens culinaris* Medik.), le pois (*Pisum sativum* L.), le pois chiche (*Cicer arietinum* L.), la fève-fêverole (*Vicia fabae* L.), le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.)... etc., (ii) les oléagineux représentés surtout par l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) et le soja (*Glycine max* (L.) Merr.) et (iii) les légumes à cosses (petit pois, haricots verts ...).

En dehors des légumineuses cultivées à grande échelle et faisant l'objet d'un commerce mondial, il existe d'autres légumineuses dont la culture est limitée à certaines régions du monde. Celles-ci jouent un rôle très important dans la sécurité alimentaire des pays en voie de développement. On peut citer la cornille ou niébé (*Vigna unguiculata* subsp. *unguiculata* (L.) Walp.) qui représente le principal légume sec cultivé en Afrique, le dolique ou pois antaque (*Vigna unguiculata* subsp. *cylindrica* (L.) Verdc.) cultivé dans les tropiques... etc. (Cullis & Kunert, 2016).

La production et la consommation des légumineuses augmentent de plus en plus dans tout le globe en raison de leurs qualités nutritionnelles et de leurs utilisations industrielles. Les légumineuses constituent également un élément important des agrosystèmes dans le monde entier. Ils restaurent l'azote atmosphérique et la fertilité des sols et réduisent fortement le recours aux engrais azotés. Jaiwal et Singh (2003) et Schneider et *al.* (2015) attribuent aux légumineuses les caractéristiques suivantes :

- Des fleurs en forme de papillon (fleurs papilionacées) pour la plupart des espèces cultivées ;
- Des gousses qui sont botaniquement des fruits issus du développement de l'ovaire et qui contiennent les graines ;
- La capacité d'utiliser l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) pour produire ses propres composants protéiques. Cette capacité est permise grâce à une symbiose avec des bactéries telluriques fixatrices de l'azote (*Rhizobium*) au sein d'organes spécialisés dits nodules qui se développent sur les racines.
- La richesse de leurs graines en protéines, certaines espèces, telles que le soja et l'arachide, ont des graines très riches en lipides également.

Par leur capacité de fixer le  $N_2$  et contrairement aux autres végétaux cultivés, les cultures légumineuses n'ont en général pas besoin de fertilisation d'une part, d'autre part, cette caractéristique leur réserve une place prépondérante dans les systèmes de production et les calendriers agricoles (Widholm, 2003).

## II-1-2. Botanique

Les légumineuses sont des plantes dicotylédons appartenant à la famille botanique des *Fabaceae ex-Leguminosae*, ordre des *Fabales*. Cette famille qui regroupe environ 750 genres, occupe le troisième rang par le nombre d'espèces (16 000 à 19 000 espèces, dépendant des taxonomistes), après les composées et les orchidées (Allen & Allen, 1981 ; Smartt, 1996). Les légumineuses cultivées appartiennent à la sous-famille des *Faboideae, ex-Papilionoideae* et plus précisément aux tribus des *Vicieae* (Fève, pois, lentilles), des *Cicereae*, (pois chiche) des *Phaseoleae* (haricot) et des *Trifolieae* (trèfle).

## II-1-3. Intérêt nutritionnel

Les graines de légumineuses sont caractérisées à la fois par une forte densité énergétique et une forte densité nutritionnelle. Elles apportent des protéines, des fibres, des glucides, des vitamines du groupe B, du fer, du cuivre, du magnésium, du manganèse, du zinc et du phosphore (Tableau 03). Ces aliments ont également un faible index glycémique et un effet hypocholestérolémiant (Rémond & Walrand, 2017).

Les graines de légumineuses contiennent également des facteurs antinutritionnels tels que les polyphénols, les tannins (antiprotéases) et les phytate, mais ces facteurs sont fortement inactivés par la cuisson. Les protéines de légumineuses sont relativement riches en lysine, mais elles sont relativement pauvres en acides aminés soufrés.

A cet effet, elles complètent bien les protéines des céréales, généralement déficientes en lysine (Cheftel & Cheftel, 1992).

**Tableau 03 :** Teneurs moyennes des graines de légumineuses en différents nutriments (pour 100g de graines crues). Rémond & Walrand (2017).

|             | Energie<br>(kcal) | Protéines<br>(g) | Lipides<br>(g) | Glucides<br>(g) | Fibres<br>(g) | Fer<br>(mg) | Zinc<br>(mg) | Calcium<br>(mg) |
|-------------|-------------------|------------------|----------------|-----------------|---------------|-------------|--------------|-----------------|
| Haricot     | 333               | 23,4             | 0,9            | 60,3            | 15,2          | 10,40       | 3,67         | 240             |
| Lentilles   | 352               | 24,6             | 1,1            | 63,4            | 10,7          | 6,51        | 3,27         | 35              |
| Pois chiche | 378               | 20,5             | 6,0            | 63,0            | 12,2          | 4,31        | 2,76         | 57              |
| Pois        | 352               | 23,8             | 1,2            | 63,7            | 15,5          | 4,82        | 3,55         | 37              |
| Fève        | 341               | 26,1             | 1,5            | 58,3            | 25,0          | 6,70        | 3,14         | 103             |
| Soja        | 446               | 36,5             | 19,9           | 30,2            | 9,3           | 15,70       | 4,89         | 277             |

## II-1-4. Importance

### II-1-4-1. Dans le monde

Le cycle végétatif relativement court, l'aptitude à s'adapter à aux différents climats et à plusieurs systèmes de culture, la tolérance aux stress abiotiques, en particulier la sécheresse, et la valeur nutritionnelle et industrielle font des légumineuses l'une des plus importantes cultures pratiquées mondialement (Kole, 2007).

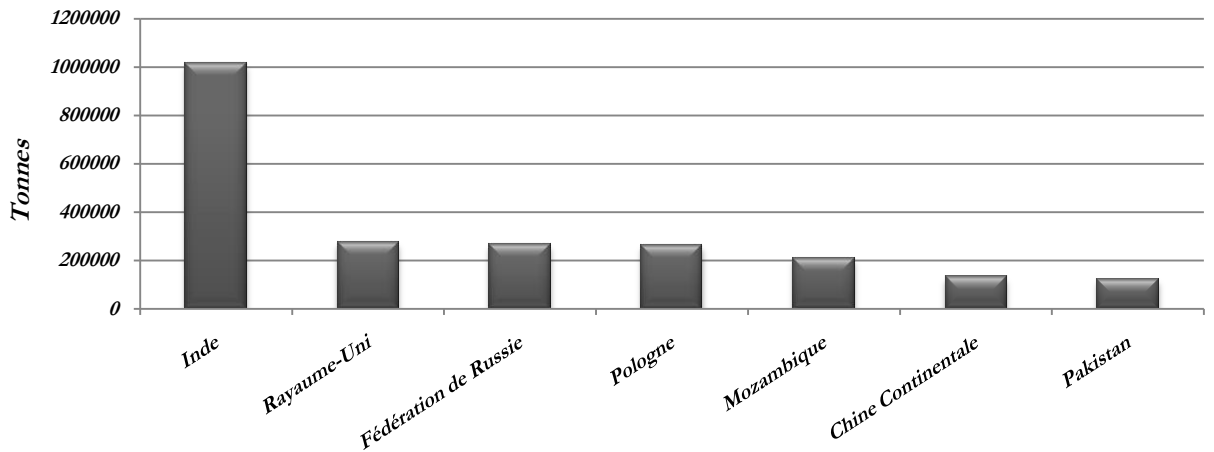
D'après le FAO (Food and Agriculture Organisation ou Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture), en 2017, les superficies cultivées par des légumineuses à l'échelle mondiale avoisinaient les 5 612 033 ha avec une production totale de 4 232 978 tonnes dont 47,5% sont produites en Asie.

Par pays, le premier producteur mondial reste de très loin l'Inde qui en 2017, a produit 953 005 tonnes soit 22,5% de la production mondiale. Les graphiques ci-après illustrent les moyennes de production des légumineuses de 2012 à 2017 des principaux pays producteurs (Figure 07) et les quantités produites en 2017 (Figure 08).

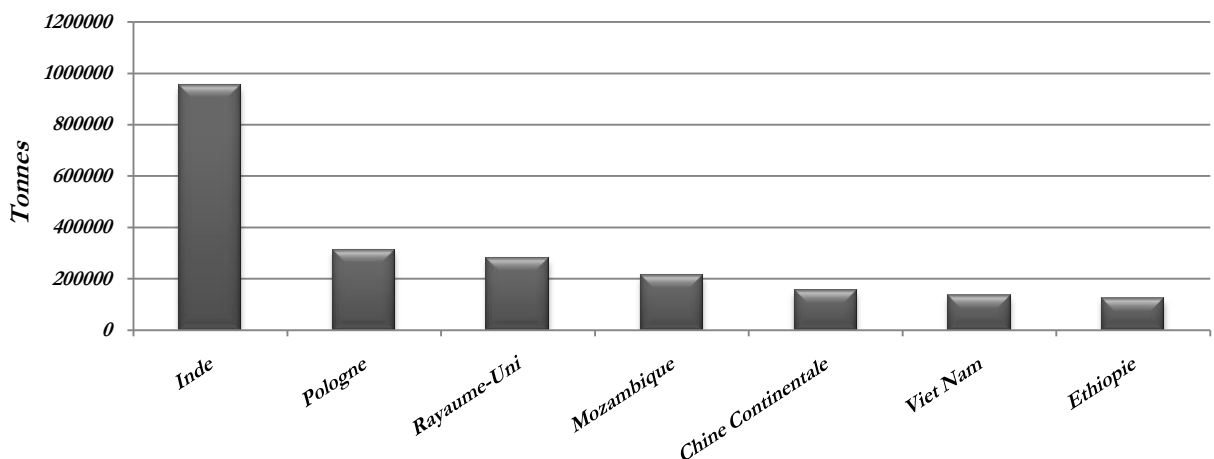
### II-1-4-2. En Algérie

A l'instar des pays en voie de développement, les légumineuses alimentaires occupent en Algérie une place importante dans le secteur agricole, mais aussi dans l'alimentation de la population. Les graines de légumineuses sont l'une des principales

sources de protéines, particulièrement pour les ménages à faible bourse, vu que ce type de protéines reste plus accessible que celui d'origine animale.



**Figure 07 :** Production des légumineuses des principaux pays producteurs. Moyenne. Période 2012-2017. Adapté de FAOSTAT 2019. <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC/visualize> (Consulté le 07/06/2019).



**Figure 08 :** Production des légumineuses des principaux pays producteurs pour l'an 2017. Adapté de FAOSTAT 2019. <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC/visualize> (Consulté le 07/06/2019).

En dépit des efforts déployés pour dynamiser l'agriculture en général, l'Algérie connaît un grave déficit dans la production de légumineuses alimentaires. Pour longtemps les programmes nationaux de développement agricole se sont davantage concentrés sur les céréales et ont accentué le déficit des légumineuses.

Les investissements dans la mécanisation, les engrais et la mise en place de politiques de crédit et de prix n'ont pas suffi à stimuler la production. Les besoins du pays en légumes secs, qui ne cessent d'augmenter, demeurent insatisfaits et ne sont couverts que par le recours aux importations. Les premières opérations d'importation des légumineuses, pois chiche en particulier, ont débuté en 1975 (Benbelkacem, 1988).

La production locale en légumineuses alimentaires reste très faible comparativement à d'autres pays producteurs. A titre indicatif, cette production a frôlé les 96 000 tonnes en 2013, année connue pour sa forte pluviométrie. Les quantités produites passent en 2016 à 77300 tonnes, pour une superficie de 77400ha environ (Figure 09).

Par culture, la production de légumes secs est dominée par la fève-féverole qui occupe le premier rang suivie par le pois chiche et le pois (Figure 10). S'agissant des légumineuses consommées en vert (fèves vertes, petits pois, haricots verts), malgré les grands écarts des quantités produites par rapport aux légumes sec, la fève occupe également le premier rang suivie par les petits pois et en fin les haricots verts (Figure 11).

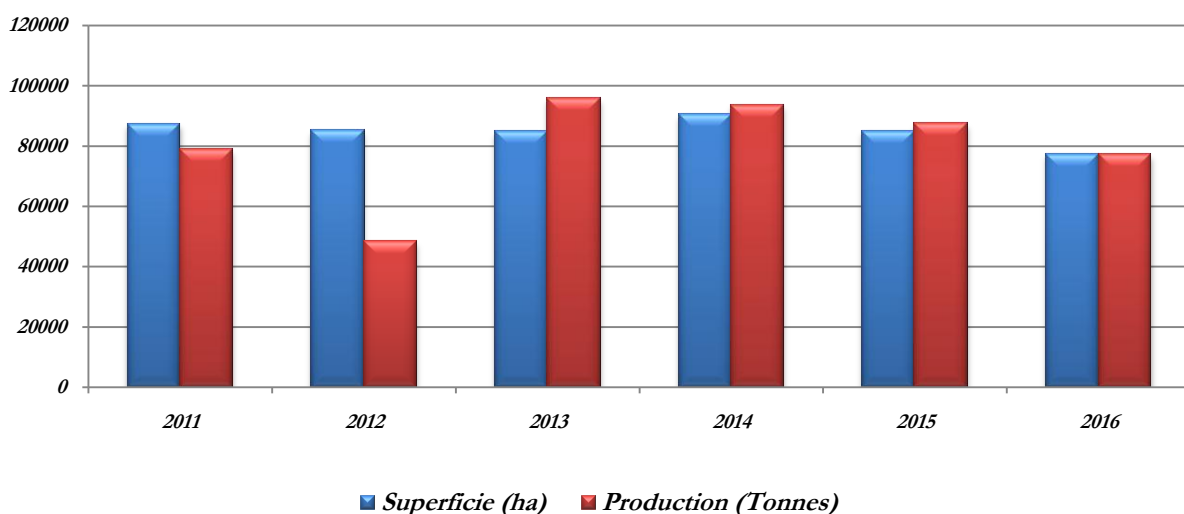


Figure 09 : Production algérienne en légumes secs. Période 2011-2016.  
Source : Statistiques Agricoles, Ministère de l'Agriculture.

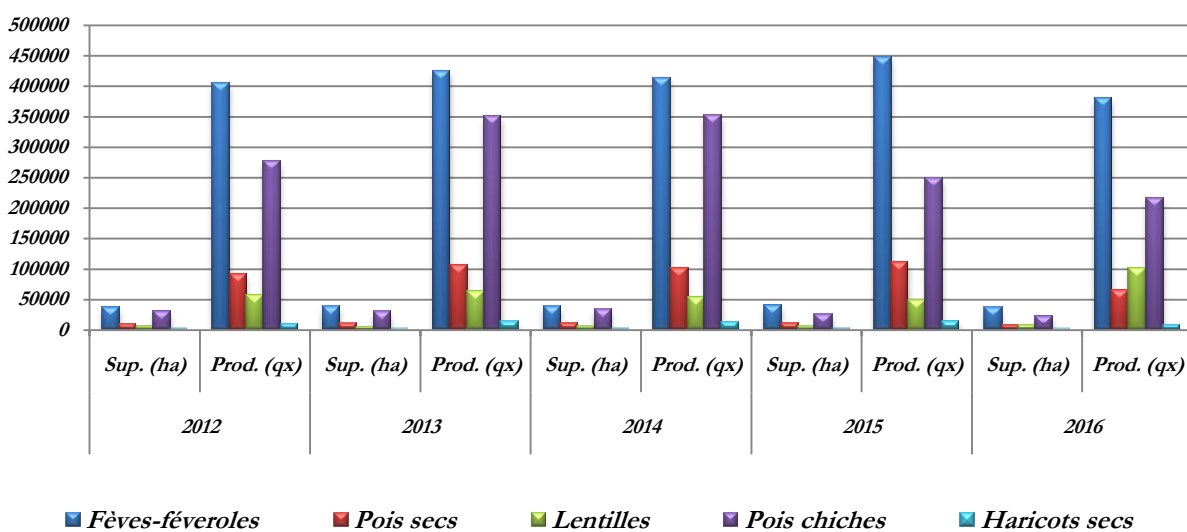
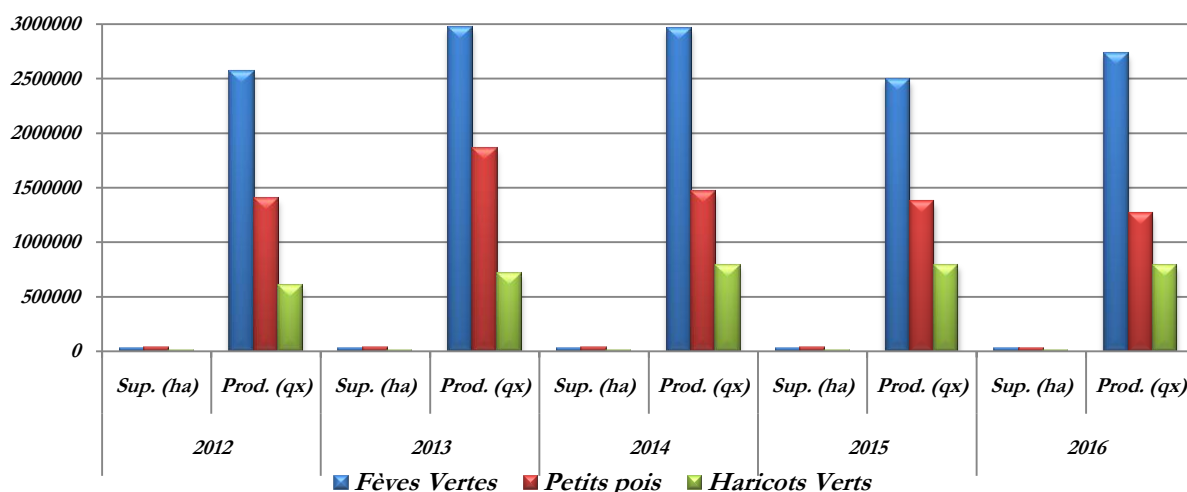


Figure 10 : Production algérienne par culture de légumes secs. Période 2012-2016.  
Source : Statistiques Agricoles, Ministère de l'Agriculture.



**Figure 11** : Production algérienne de légumineuses consommées vertes. Période 2012-2016. Source : Statistiques Agricoles, Ministère de l'Agriculture.

## II-2. L'ascochytose

### II-2-1. Introduction

Comme la plupart des plantes cultivées, les légumineuses alimentaires peuvent subir les effets de contraintes abiotiques et biotiques s'opposant à leur développement normal, ce qui se traduit par des baisses de rendements et de rentabilité (Solh & *al.*, 1994 ; Rubiales & *al.*, 2014). Cependant, le long de leur cycle de croissance, les cultures de légumineuses sont affectées entre autres par différentes maladies fongiques telles que la tache chocolat, l'antracnose, la rouille, l'oïdium, le mildiou et l'ascochytose (Johansen & *al.*, 1994 ; Monti & *al.*, 1994 ; Herath & *al.*, 2001 ; Grünwald & *al.*, 2004 ; Chen & *al.*, 2011).

L'importance relative de ces maladies et leurs effets sur les rendements varient énormément d'une région à une autre contrairement à l'ascochytose qui est mondialement distribuée et qui sévit dans l'ensemble des pays et des zones où les légumineuses alimentaires sont cultivées (Tivoli & Banniza, 2007 ; Rubiales & Fondevilla, 2012).

L'ascochytose, comme maladie des légumineuses, est également connue sous d'autres noms, au Canada elle est dite brûlure ascochyitique, elle est aussi nommée anthracnose, néanmoins ce dernier nom est de moins en moins utilisé puisqu'il prête confusion avec l'antracnose causée par *Colletotrichum sp.* L'école anglo-saxonne lui réserve le nom de « Ascochyta blight ». La maladie a été décrite pour la première fois sur pois chiche en 1911 par Butler au Pakistan (Nene, 1982 ; Nene & Reidy, 1987). Actuellement elle s'étend de l'Australie et de l'Asie du Sud-est à l'Amérique du Nord et l'Amérique latine en passant par l'Europe et l'Afrique du Nord (Ozkilinc & *al.*, 2010 ; Kaiser & *al.*, 2000). En Algérie, cette maladie n'est pas récente, Landy et Le Bot (1958) rapportent

qu'elle a déjà suscité une étude menée par Aumont et Chevasses en 1956, ce qui revient à dire qu'elle y existait bien avant cette date. Actuellement, la maladie persiste toujours où beaucoup d'auteurs la signalent, surtout sur pois et pois chiche, dans différentes régions d'Algérie (Setti & *al.*, 2009 ; Tadjia & *al.*, 2009, Bendahmane & *al.*, 2012 ; Labdi & *al.*, 2013 ; Mahiout & *al.* 2015).

La majorité voire la totalité des auteurs s'accordent à considérer l'ascochytose comme la plus importante et la plus dévastatrice des maladies affectant les légumineuses alimentaires dans le monde entier où elle conduit à des pertes considérables (Peever & *al.*, 2007 ; White & Chen, 2007). Les attaques les plus sévères réduisent fortement les rendements en plus de la dépréciation de la qualité des récoltes et peuvent aboutir parfois à l'anéantissement total des cultures (Davidson & Kimber, 2007 ; Rubiales & *al.*, 2018).

En Algérie et dès son signalement, la maladie a pris de l'importance au point de la considérer comme le facteur phytosanitaire qui entrave le plus la production des fabacées. Les chiffres concernant l'évolution exacte des pertes occasionnées n'ont pas été estimés. Cependant, il a été rapporté que l'ascochytose a souvent entraîné la destruction de parcelles entières de pois et de pois chiche durant les années de forte pluviométrie (Benbelkacem, 1988 ; Zaghouane, 1997).

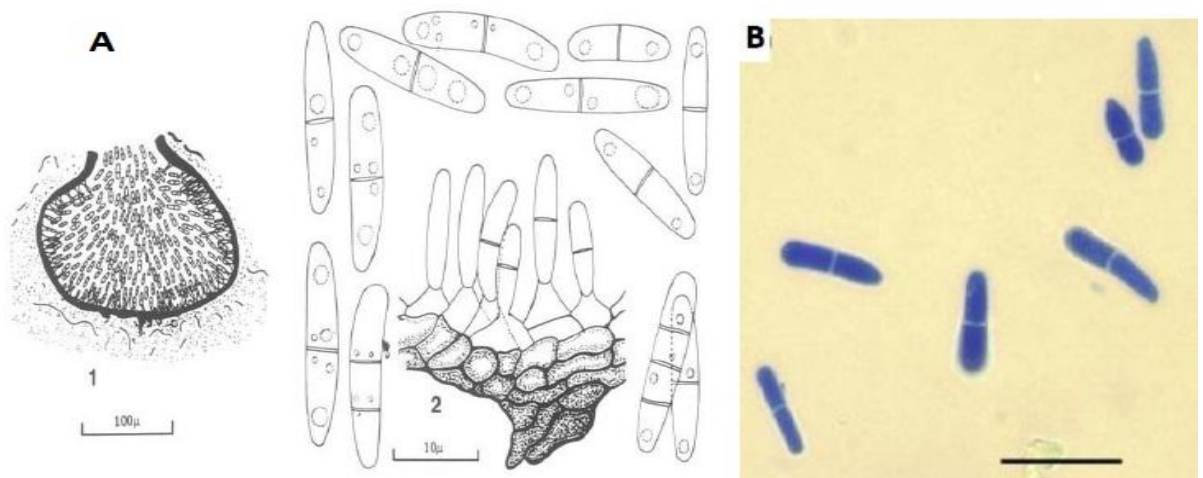
L'ascochytose est une maladie foliaire, affectant tous les organes aériens des légumineuses (Tivoli & *al.*, 2006). Elle est causée par un ensemble de champignons appartenant à un coelomycete du genre *Ascochyta* (Rubiales & Fondevilla, 2012). Conséquence du phénomène de la spécificité d'hôte qui caractérise le genre *Ascochyta*, différentes espèces de ce genre affectent différentes espèces de légumineuses (Hernandez-Bello & *al.*, 2006 ; Peever, 2007 ; Tivoli & Banniza, 2007 ; Kim & *al.* 2016).

Cependant, l'ascochytose de la fève-fèverole est causée par *Ascochyta fabae* (Ahmed & *al.*, 2016), celle de la lentille est attribuée à *Ascochyta lentis* (Rodda & *al.*, 2017), alors que sur pois chiche c'est *Ascochyta rabiei* qui en est la cause (Li & *al.*, 2017). Contrairement aux légumineuses précédentes où la maladie est causée par un seul agent pathogène, l'ascochytose du pois est attribué à trois espèces appartenant toutes au genre *Ascochyta* et connues sous le nom du complexe-*ascochyta*. Il s'agit de *A. pisi*, *A. pinodes* et *A. pinodella* (Tivoli & *al.*, 2006 ; Davidson & *al.*, 2013). La maladie peut être induite par les trois espèces en association ou séparément avec une prévalence et une virulence de *A. pinodes* (Gossen & *al.*, 2011 ; Tran & *al.*, 2014a).

## II-2-2. Ascochytose de la fève

La fève est susceptible d'être attaquée par différents agents pathogène, néanmoins, l'ascochytose est considérée comme l'une des maladies les plus importantes économiquement (Stoddard & *al.*, 2010 ; Redden & *al.*, 2014). Il s'agit d'une maladie foliaire induite par un champignon nécrotrophe dit *Ascochyta fabae* Spegazzini. (anamorphe) (synonyme *Ascochyta fabae f. sp. fabae* Gossen B.D., Sheard J.W., Beauchamp C.J., & Morrall R.A.A.), téléomorphe *Didymella fabae* Jellis & Punithalingam (Jellis & Punithalingam, 1991 ; Torres, 2006). Vu la grande ressemblance entre *A. fabae* et *A. lentis*, certains chercheurs considèrent les deux champignons comme une seule espèce avec deux formes spécialisées et le nom de *A. fabae f. sp. fabae* Gossen & *al.* lui a été proposé (Gossen & *al.*, 1986 ; Ye, 2002).

Initialement, le champignon n'était connu que sous sa forme imparfaite ou asexuée (anamorphe), il a été signalé pour la première fois en Argentine par Spegazzini en 1899. La forme parfaite ou sexuée (téléomorphe) a été décrite pour la première fois au Royaume-Uni par Jellis et Punithalingam (1991) en l'isolant des restes d'une culture de fève et l'identifiant comme *Didymella fabae*. *D. fabae* Jellis & Punith. a ensuite été signalé en Australie (Jellis & *al.*, 1998), en Syrie (Bayaa & Kabbabeh, 2000), en Espagne (Rubiales & Trapero-Casas, 2002) et en Tunisie (Omri Benyoussef & *al.*, 2012). Comme toutes les *Ascochyta spp.* *A. fabae* se reproduit de façon asexuée via des pycnidiospores (pycniospores) produites dans des pycnides (Figure 12), les pycniospores sont hyalines, droites parfois légèrement incurvées et chacune porte un seul septum (Tivoli & Banniza, 2007). Quant à la reproduction sexuée, *A. fabae* est hétérothallique avec deux mating types et dont la reproduction est assurée à travers des ascospores (Kaiser & *al.*, 1997 ; Barve & *al.*, 2003 ; Peever & *al.*, 2007 ; Ozkilinc & *al.*, 2015).



**Figure 12 :** (A) Représentation schématique de *A. fabae*, (A1) pycnidium, (A2) partie de la paroi pycnidiale, cellules conidiogènes et pycniospores. Punithalingam & Holliday, *in* Snowdon (2010). (B) pycniospores de *A. fabae*. Bar = 20 μm. Chilvers & *al.* (2009).

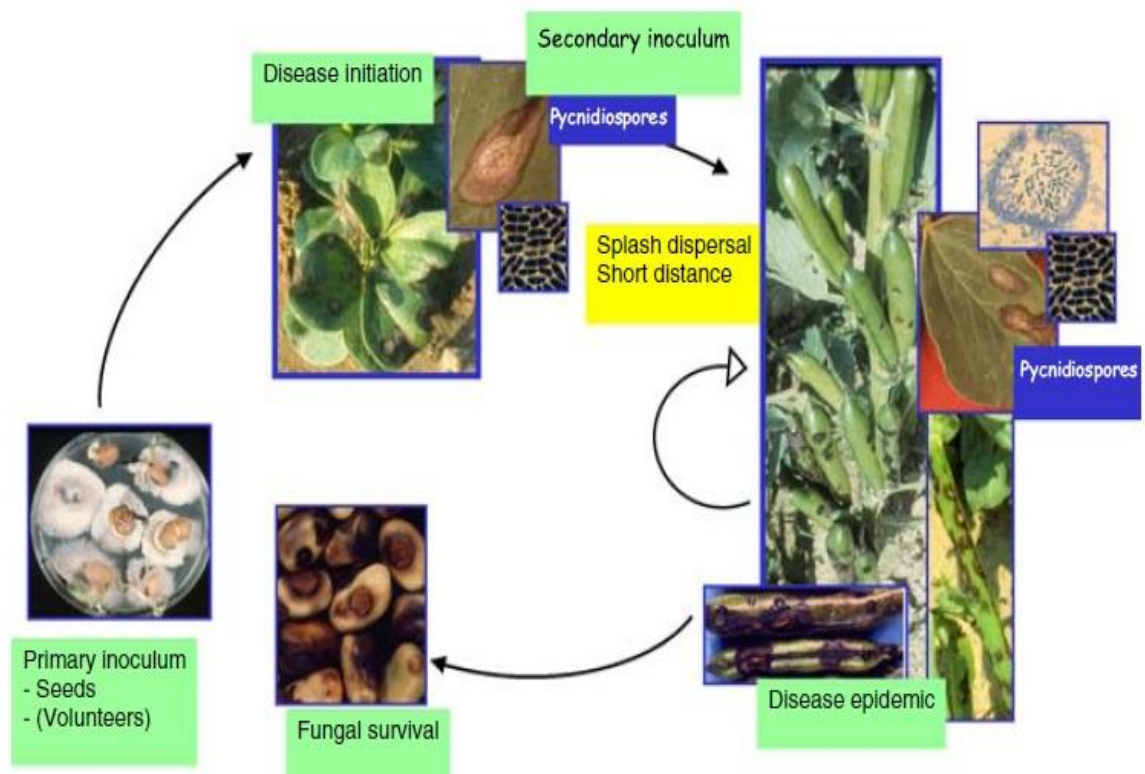
La maladie est très répandue sous les climats de type méditerranéen ou océanique doux, en particulier sur les cultures d'hiver. Au printemps elle se propage rapidement avant même que la plante ne commence à fleurir (Ahmed & *al.* 2016). En Europe, en Asie et en Afrique du Nord, l'ascochytose peut conduire à des pertes de rendement de l'ordre de 35 à 40%, avec des cultivars sensibles et sous des conditions climatiques favorables, les pertes peuvent atteindre 90% (Sillero & *al.*, 2001 ; Avila, 2004 ; Kharrat & *al.*, 2006 ; Sillero & *al.*, 2010 ; Sillero & *al.*, 2012).

Les symptômes concernent tous les organes aériens de la plante. Ils se manifestent sous forme de lésions nécrotiques qui apparaissent sur les feuilles, âgées surtout, sur les tiges et sur les gousses. Les lésions sur feuilles sont généralement circulaires, brun foncé et mesurent en moyenne 1 mm de diamètre. Après, elles deviennent plus grosses et légèrement enfoncées, avec un centre allant du brun pâle au gris foncé et entourées d'une large marge sombre de couleur chocolat, ce qui peut parfois entraîner une confusion avec des lésions de la tache chocolat, maladie causée par *Botrytis fabae* Sardina (Madeira & *al.*, 1993 ; Elzbieta, 1997 ; Rhaiem & *al.*, 2002). Lorsque les taches s'agrandissent, leur forme devient plus irrégulière et se fusionnent pour couvrir de plus grandes surfaces de la feuille. Des pycnides noires se développent alors au sein des lésions, en particulier à mesure que les feuilles vieillissent. Les pycnides peuvent varier en abondance et sont souvent disposées en cercles concentriques. Sur les tiges, les lésions sont généralement plus petites au début de l'infection, mais elles s'allongent le long de la tige et s'enfoncent plus profondément que sur feuilles (Muehlbauer & Chen, 2007 ; Ozkilinc & *al.*, 2015). Elles sont généralement plus sombres que celles des feuilles et contiennent des pycnides dispersées. Lorsque les lésions sont profondément enfoncées, les tiges des plantes peuvent se casser (Jellis & *al.*, 1998 ; Kohpina & *al.*, 1999). Sur gousses, des lésions peuvent se produire et se développer à la surface et s'enfoncent après avec une production abondante de pycnides en condition humides et les graines sont alors infectées (Snowdon, 2010).

*A. fabae* est un pathogène séminicole, d'où le déclenchement de l'infection au niveau des parties basales des plantes. A cet effet, la gravité de la maladie selon Tivoli et Banniza (2007), est généralement très élevée dans les parties inférieures des plantes que dans les parties les plus hautes. Maurin et Tivoli (1992) font la distinction de trois phases dans le cycle épidémique de l'ascochytose de la fève (Figure 13) :

- ✓ L'initiation de la maladie qui se caractérise par l'apparition de quelques lésions sur les plantules, le champignon se transmet alors de plante en plante et l'incidence de la maladie augmente rapidement surtout si l'établissement des cultures en hiver coïncide

- avec un temps froid et humide ; conditions généralement favorables au développement du pathogène sur les plantules à croissance lente.
- ✓ La phase suivante d'infection des plantes débute souvent à la fin de l'hiver, où les plantes se développent plus rapidement. Les lésions, initialement limitées au feuillage, se développent sur les tiges et se propagent au sommet de la plante. L'épidémie peut être réduite lorsque les conditions climatiques, les précipitations surtout, ne sont pas propices à la propagation alors que la croissance des plantes est plus rapide. Par conséquent, les plantes peuvent échapper temporairement aux attaques car leur croissance devient plus rapide que la progression du pathogène. Au cours de cette seconde phase épidémique, la propagation du champignon et l'incidence de la maladie dépendent fortement de la pluviométrie et de la pression de l'inoculum, conséquence de l'infection initiale.
  - ✓ La troisième phase est une phase d'infection des gousses, le pathogène infecte les gousses qui se développent sur les nœuds infectés. La dispersion des conidies par éclaboussures pendant la pluie (effet splash) facilite la contamination des gousses les plus basses. Cette phase a lieu lorsque la croissance de la plante ralentit après le stade de floraison, ainsi que pendant l'initiation et le remplissage des gousses. À ce stade de croissance de la plante, même une légère pression de la maladie peut causer de graves dommages, car l'infection des gousses provoque l'infection des graines.



**Figure 13 :** Cycle de l'ascochytose de la fève (*Vicia faba* L.). Tivoli et Banniza (2007).

### II-2-3. Ascochytose de la lentille

Comme pour l'ensemble des légumineuses alimentaires, l'ascochytose est l'une des maladies les plus contraignantes de la culture de la lentille et conduit souvent à des pertes considérables de rendement (Fratini & al., 2014 ; Sari & al., 2017 ; Sari & al., 2018). La maladie a été signalée pour la première fois l'an 1934 en Inde et depuis, elle a été signalée à travers le monde entier, là où la lentille est cultivée (Sudheesh & al., 2016).

C'est une maladie foliaire causée par *Ascochyta lentis* Vassiljevsky (synonyme : *Ascochyta fabae* f. sp. *lentis* Gossen B.D., Sheard J.W., Beauchamp C.J., & Morrall R.A.A.), téléomorphe *Didymella lentis* W.J. Kaiser, B.C. Wang & J.D. Rogers (Rodda & al. 2017). *A. lentis* fut identifié et décrit pour la première fois en 1940 par Bondartzeva-Monteverde et Vassilievsky en Russie (Ye & al., 2002).

Morphologiquement, l'espèce *A. lentis* est très semblable à *A. fabae* et en dehors de la spécialisation vis-à-vis de leurs hôtes respectifs, il est difficile de les distinguer, par conséquent beaucoup de mycologues considèrent ce champignon comme une forme spéciale de *A. fabae* et lui donne le nom de *A. fabae* f. sp. *lentis* Gossen & al. (Gossen & al., 1986 ; Kaiser & al., 1997 ; Ye & al., 2002 ; Kim & al., 2016). Il est caractérisé par ses pycnides globulaires de diamètre variant entre 175 à 300µm et disposés en anneaux concentriques. Les conidies (pycnidiospores), de taille oscillant entre 11,5 et 19,5µm, sont hyalines, cylindriques avec des extrémités arrondies, droites et rarement incurvées. Elles sont généralement bi-septées, en très faible pourcentage, d'autres sont tri-septées (Ford & al., 2011). Comme *A. fabae*, *A. lentis* est hétérothallique exigeant deux mating types pour produire le téléomorphe (Ahmed & al., 1996a ; Davidson & al., 2014).

L'ascochytose de la lentille est caractérisée par des lésions nécrotiques sur feuilles, tiges et gousses, des chutes prématurées des feuilles, des flétrissements des pointes des branches et des ruptures de tiges. En dépit des pertes de rendement, la gravité de la maladie aboutit également à la décoloration et à la dépréciation de la qualité des graines récoltées. Les nécroses sur feuilles sont généralement arrondies avec des marges marron, alors que sur gousses, elles sont plus ou moins oblongues et irrégulières, sur tiges elles sont allongées et peuvent la ceinturer en provoquant sa rupture. Au niveau des centres des lésions nécrotiques, des pycnides apparaissent surtout sur feuilles et gousses. Dans les cas d'infections sévères, la taille des gousses et des graines est fortement réduites en plus de leur décoloration (Tivoli & al., 2006 ; Ford & al., 2011).

Du point de vue épidémiologique, le cycle de l'ascochytose de la lentille est superposable à celui de la fève (Tivoli & Banniza, 2007). L'infection des jeunes plantules

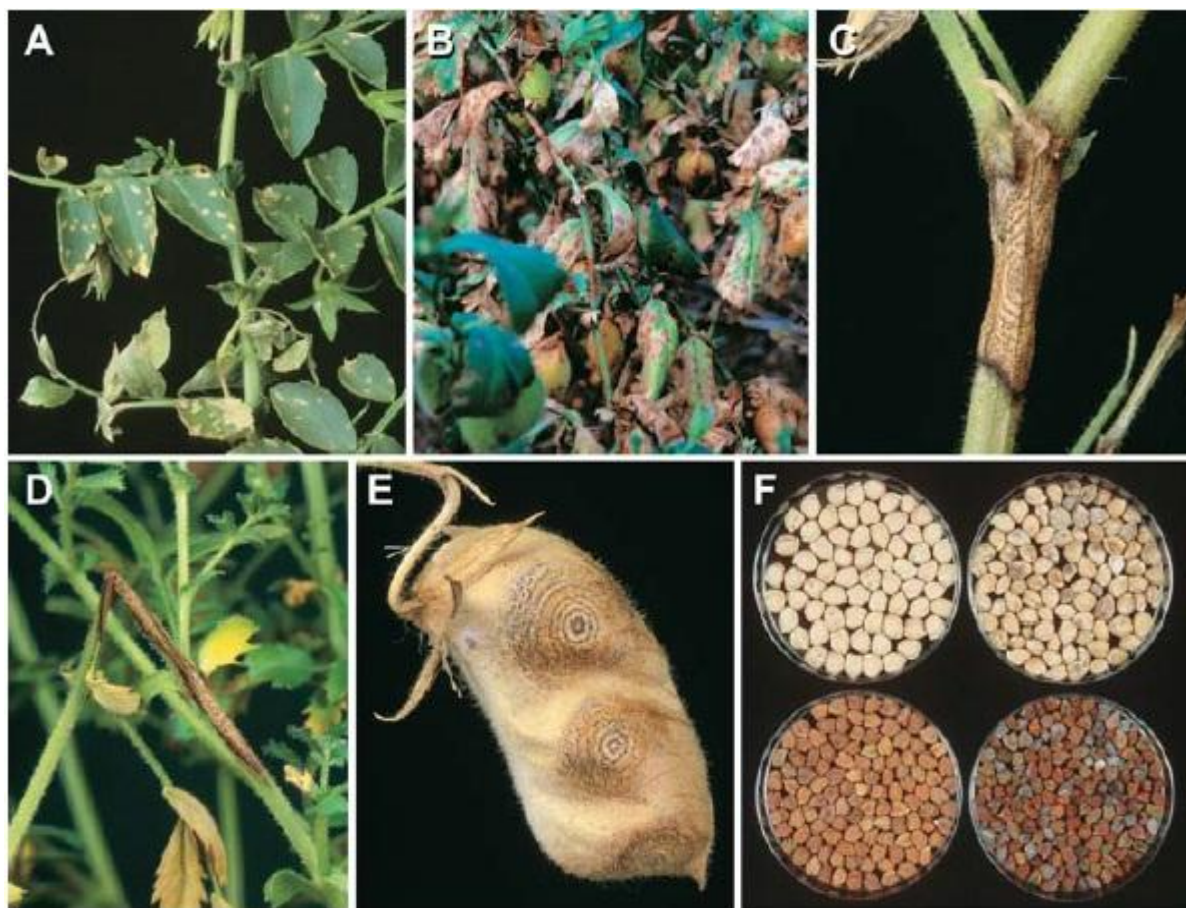
prend, comme source d'inoculum primaire, les semences infectées par le mycélium et les conidies du pathogène. Sous environnement froid et humide, l'inoculation primaire peut être assurée par des ascospores à dispersion anémophile provenant particulièrement des débris de plantes infectées des cultures précédentes (Ahmed & *al.*, 1996b). Après la phase d'infection, le pathogène se propage d'un organe à un autre et d'une plante à une autre en produisant des pycnidiospores qui forment l'inoculum secondaire et le cycle épidémique se répète ainsi (Pedersen & Morrall, 1995).

#### **II-2-4. Ascochytose du pois chiche**

L'ascochytose est l'une des contraintes biotiques les plus importantes limitant la culture du pois chiche (Mantri & *al.*, 2010 ; Rasool & *al.*, 2015 ; Li & *al.*, 2015). Causée par le champignon *Ascochyta rabiei*, elle est considérée comme la maladie la plus dévastatrice et qui provoque le plus de dégâts et de pertes (Gan & *al.*, 2006 ; Tar'an & *al.*, 2007 ; Singh & *al.*, 2014 ; Li & *al.*, 2017). A titre indicatif, dans les pays du bassin méditerranéen, les pertes de rendement les plus importantes sont surtout enregistrées sur des cultures d'hiver (Porta-Puglia, 1990). Nene (1982), Nene et *al.* (1996), Jhorar et *al.* (1997), Pande & *al.* (2005) et Iruela et *al.* (2007), estiment que si les conditions climatiques pendant la saison de la culture sont favorables au développement de la maladie, à savoir des températures de 15 à 25° C, avec un optimum de 20° C et des précipitations avoisinant les 150 mm, les pertes de rendement sont souvent totales. Les mêmes auteurs rapportent également que la maladie est mondialement distribuée et affecte le pois chiche en Afrique du Nord, en Amérique Latine, en Australie, au Bangladesh, en Bulgarie, en Italie, dans les républiques de l'ex-URSS, au Canada, en Inde, au Pakistan, en Syrie, en Iran, en Turquie et aux USA.

##### **II-2-4-1. Symptômes**

L'ascochytose affecte tous les organes ariens du pois chiche (Figures 14 et 15), cependant les symptômes concernent les feuilles, les pétioles, les tiges, les gousses et les graines (Basandrai & *al.*, 2007 ; Shahid & *al.*, 2008). Initialement, l'infection produit des petites lésions qui se transforment graduellement en taches nécrotiques. Les lésions sur feuilles sont de forme arrondie avec des marges marron foncées et un centre gris clair autour duquel s'arrangent des pycnides en cercles concentriques. Sur tiges et pétioles les nécroses sont plus ou moins allongées avec des pycnides disposés en ronds ovales et elles conduisent souvent à la rupture des tiges. Les lésions sur gousses sont semblables à celle sur feuilles et s'étendent souvent aux graines provoquant ainsi leur décoloration et leur déformation (Pande & *al.*, 2005).



**Figure 14** : Symptômes de l'ascochytose du pois chiche : (A) Lésions sur feuillage, (B) Symptômes foliaires sévères (nécroses), (C) Lésions sur tige montrant les pycnides, (D) Rupture de la tige due à la ceinturasson, (E) Lésions avec cercles concentriques de pycnides sur gousse, (F) Graines saines et infestées (gauche, droite respectivement, type Kabouli en haut et type Desi en bas). Chongo & Gossen (2003).

#### II-2-4-2. Agent causal

*Ascochyta rabiei* (Passerini) Labrousse [téléomorphe *Didymella rabiei* (Kovatschevski) Arx (synonyme *Mycosphaerella rabiei* Kovatschevski)] est à l'origine de l'ascochytose du pois chiche (White & Chen, 2007 ; Frenkel & *al.*, 2010, Bahr & *al.*, 2016). Le champignon a été décrit pour la première fois en 1867 par Passerini, qui le nomme alors *Zythia rabiei* en se basant sur l'observation de pycniospores hyalines et unicellulaires (Nene, 1982). En 1930, Labrousse le décrit comme étant *Phyllosticta rabiei*, car pour sa part il ne décela pas la présence de conidies bicellulaires sur un prélèvement direct d'un hôte atteint de maladie, bien que quelques-unes aient été observées sur des spécimens cultivés. Un an plus tard (1931), le même chercheur proposa le nom de *Ascochyta rabiei* après avoir remarqué que le champignon produisait 02 à 04% de conidies uni-septées (bicellulaires) sur des hôtes inoculés artificiellement. Actuellement, certaine divergence persiste encore concernant le nom de ce champignon mais, *Ascochyta rabiei* est le nom adopté par la majorité des chercheurs spécialistes (Shahid & *al.*, 2008).

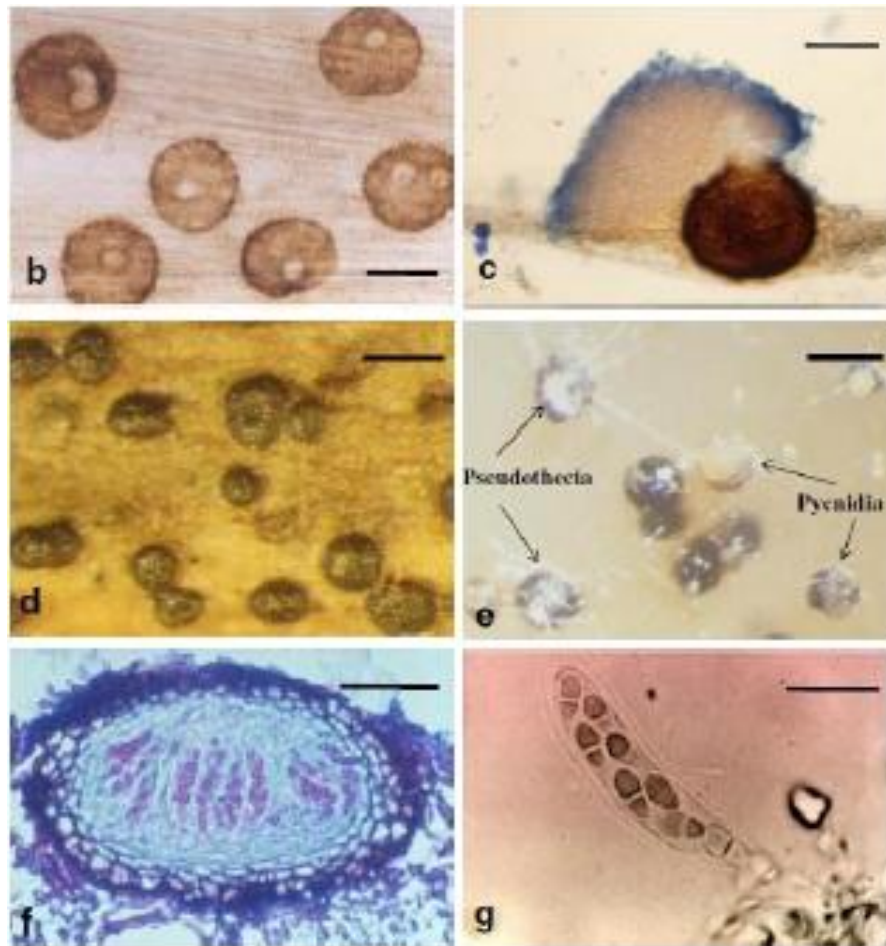


**Figure 15** : Symptômes de l'ascochytose du pois chiche : (G) sur graines, (H) sur folioles, (I) Sur tige, (J) sur gousse. Islam & *al.* (2017).

*A. rabiei* se cultive facilement sur une grande variété de milieux artificiels où il y développe généralement un mycélium pâle dans lequel émergent des pycnides marron dont la paroi est constituée d'une ou deux couches de cellules et des ostioles de 30 à 50  $\mu\text{m}$  de largeur (Figure 16 : b, c). Les pycnidiospores, qui se développent dans les pycnides, sont hyalines, droites, parfois légèrement incurvées, certaines sont uni-septées (Bruns & Barz 2001).

Le téléomorphe *Didymella rabiei* (syn. *Mycosphaerella rabiei* Kovatschevski.) est hétérothallique, cependant pour que la reproduction sexuée ait lieu, il faut la présence de deux mating types compatibles désignés MAT1-1 et MAT1-2 (Barve & *al.*, 2003 ; Gurjar & *al.*, 2011). Le téléomorphe se développe naturellement hors saison de culture sur les débris et chaumes du pois chiche. Il aboutit à la formation de pseudothèces de couleur brun foncé à noir et de 120 à 270  $\mu\text{m}$  de diamètre (Figure 16 : d).

À maturité, les pseudothèces laissent apparaître des asques (Figure 16 : e, f) de 10-12 x 50-80  $\mu\text{m}$ , de forme cylindrique qui contiennent en moyenne huit ascospores chacun (Trapero-Casas & Kaiser, 2007). Les ascospores (4,5-7 x 9,5-16 $\mu\text{m}$ ) sont hyalines, de forme ellipsoïdales à biconiques et bicellulaires (Kaiser, 1997 ; Armstrong & *al.*, 2001).



**Figure 16 :** L'anamorphe et le téléomorphe de *D. rabiei*. (b, c) Pycnides sur tissus de la tige du pois chiche. (d) Pseudothèces sur tissus de la tige du pois chiche. (e) Pseudothèces et pycnides sur le milieu eau Gélosée additionné de 40 g de poudre de tige du pois chiche. (f) Pseudothèce avec asque et ascospores. (g) Détail d'asque et d'ascospores. Trapero-Casas & *al.* (2012).

### II-2-4-3. Taxonomie

Selon Gupta et Paul (2002), Muthaiyan (2009), Akamatsu et *al.* (2012) et Bahr et *al.* (2016), *Didymella rabiei* (Kovatschevski) Arx, anamorphe *Ascochyta rabiei* (Passerini) Labrousse, se classe comme suit :

- Règne : *Fungi*
- Phylum : *Ascocmycota*
- Sous-phylum : *Pezizomycotina*
- Classe : *Dothideomycetes*
- Sous-classe : *Pleosporomycetidae*
- Ordre : *Pleosporales*
- Famille : *Didymellaceae*
- Genre : *Didymella*
- Espèce : *Didymella rabiei*

## **II-2-4-4. Épidémiologie**

### **a. Gamme d'hôte**

En plus du pois chiche, *A. rabiei* peut infecter d'autres espèces végétales essentiellement des *Cicer spp.* (Shahid & al., 2008). Par ailleurs, Akem (1999) et Ali et al. (2011) rapportent que, via une inoculation artificielle, ce pathogène peut également infecter d'autres légumineuses telles que la lentille, le pois, la vesce et le haricot. Khan & al. (1999) relatent que *A. rabiei* a pu être isolé à partir de d'autres espèces végétales, sans qu'il y développe des symptômes, comme *Brassica nigra* (moutarde noire) et *Triticum aestivum* (froment).

### **b. Survie et conservation**

Entre les saisons de culture de pois chiche, *A. rabiei* survie et se conserve sur ou dans les graines infectées et/ou sur les débris post-récolte du pois chiche sous forme de mycélium, de pycnides ou sous différentes formes de téléomorphe (Dugan & al., 2005 ; Bayaa & Chen, 2011). Le champignon en téléomorphe peut se conserver également à l'état libre dans le sol (Pande & al., 2005). A des températures oscillant entre 10 et 35° C, il peut survivre environ 08 mois sur des débris de pois chiche infectés (Nene & Reddy, 1987), 20 mois sur des tiges (Kaiser & Hannan, 1987) et 05 mois sur la surface des graines de pois chiche (Singh & al., 1995). Toutefois, si les débris sont enterrés par un labour profond, la survie du pathogène sera très réduite. Selon Kaiser (1997), *A. rabiei* peut survivre aussi et maintenir son pouvoir infectieux sur des semences de pois chiche conservées à 04° C pendant une durée qui peut atteindre 13 ans. Navas-Cortes et al. (1995) ont observé que, sur des débris de pois chiches laissés à la surface du sol dans des conditions naturelles, *A. rabiei* colonisait rapidement les tissus, formait abondamment des pseudothèces et des pycnides et restait viable deux années. Par contre l'enfouissement des débris réduit la viabilité de *A. rabiei* de 2 à 4 mois. Les mêmes auteurs ont remarqué l'existence d'hyphes enflés, bruns, à paroi épaisse et associés à des structures fructifères dans les tissus infectés; ils étaient incapables de distinguer des structures spécialisées de survie fongique telles que des chlamydospores ou des sclérotes à la surface ou sur des débris enterrés.

### **c. Cycle épidémique**

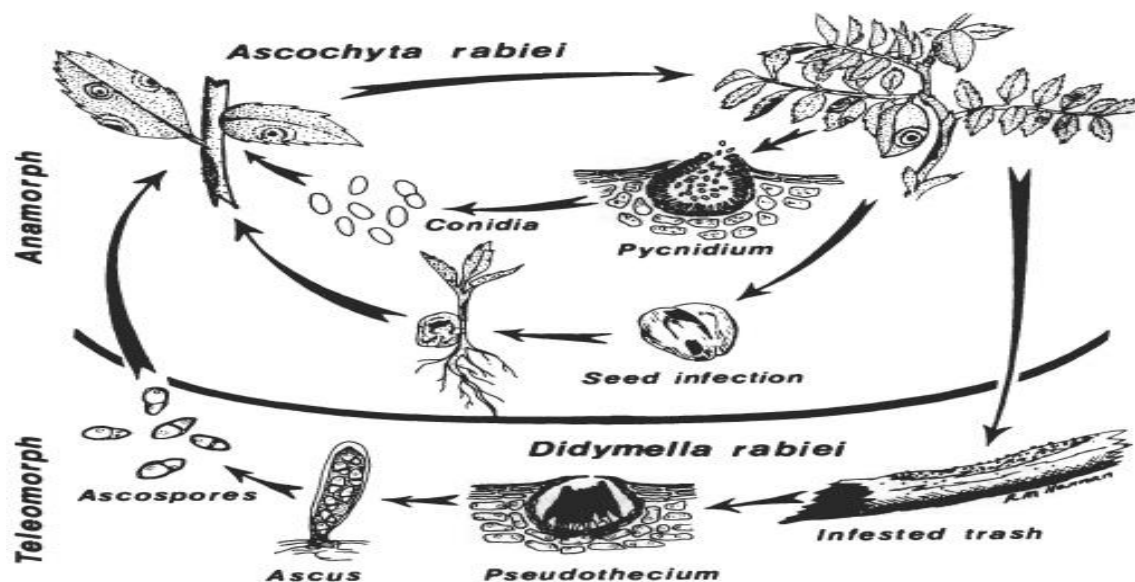
Que se soit sur pois chiche ou sur autres légumineuses, l'ascochytose due à *Ascochyta spp.* est une maladie polycyclique (Figure 17) où se succèdent en une saison de culture cinq à dix cycles (Tivoli & Banniza, 2007). Les semences infectées et éventuellement les ascospores, issues de la reproduction sexuée sur les débris et les chaumes de pois chiches en hors saisons, constituent la source de l'inoculum primaire en

s'installant sur les jeunes plantules (Peever & *al.*, 2004). Les ascospores, libérées au printemps en temps pluvieux et humide et dispersées par le vent et les conidies dispersées par les éclaboussures de pluie, infectent les différents organes et les différentes plantes de pois chiche quelque soit le stade végétatif (Chongo & Gossen, 2001).

Selon Reddy et Singh (1990), Navas-Cortés et *al.* (1998) et Bayaa et Chen (2011), les conditions optimales de l'infection se situent autour de 15 à 25° C avec 06 à 12 heures d'humidité relative élevée. A de telles conditions, les symptômes sont visibles dans les 04 à 05 jours suivant l'infection et les pycnides apparaissent 07 à 10 jours après, de nouvelles conidies sont alors disséminées, constituant ainsi une inoculation secondaire et un nouveau cycle de la maladie se déclenche (Kaiser, 1997).

#### **d. Voie d'infection**

Une fois les spores germent, *A. rabiei* pénètre dans la plante du pois chiche via la cuticule de la foliole suite à l'élongation du tube germinatif et la formation d'une structure infectieuse dite appressorium (Köehler & *al.*, 1995). L'agent pathogène se propage alors dans l'espace interstitielle à travers les lamelles moyennes des tissus du parenchyme épidermique et palissadique des folioles et de là aux tiges en passant par les pétioles. Le pathogène peut également pénétrer directement à travers la cuticule de la tige.



**Figure 17 :** Cycle épidémique de l'ascochyte du pois chiche. Kaiser (1997).

A l'intérieur de la tige, il se propage principalement dans le phloème. Les tissus non lignifiés sont complètement détruits et les tissus lignifiés, le xylème en particulier, restent plus ou moins structurellement intacts (Pandey & *al.*, 1987 ; Ilarslan & Dolar, 2002). L'invasion de ces tissus aboutit à un jaunissement, une nécrose et un encerclement de la tige avec formation importante de pycnides matures près des tissus vasculaires. La

nature nécrotrophe de l'agent pathogène lui permet alors de se développer de manière saprophyte sur les tissus morts (Jayakumar & *al.*, 2005).

## **II-2-4-5. Processus infectieux et histopathologie**

### **a. Adhésion et pénétration**

L'une des étapes les plus importantes dans le processus d'infection d'un hôte par un agent pathogène est l'adhésion à la surface de la plante (Dickinson, 2003). La première barrière rencontrée par un agent pathogène est la cuticule qui enveloppe toute la partie aérienne de l'hôte. La cuticule est formée essentiellement de cutine qui est un polyester d'acides gras hydroxylés et imprégné de cire. A la cutine, s'ajoutent la pectine et le xylane qui sont aussi des composants structurels majeurs des parois cellulaires végétales (Agris 2005).

Les tubes germinatifs émis par les spores de *A. rabiei* sécrètent de grandes quantités d'un exsudat mucilagineux qui assure une adhésion étroite sur la cuticule (Höhl & *al.*, 1990 ; Jaykumar & *al.*, 2005). Cet exsudat enrobe également le site de pénétration et protège les tubes germinatifs de la dessiccation. La pénétration de la cuticule n'est probablement pas mécanique puis qu'elle s'accompagne souvent de la production d'enzymes hydrolytiques dégradant les parois cellulaires (Jaykumar & *al.*, 2005 ; Bahr & *al.*, 2016). *A. rabiei* secrète essentiellement trois hydrolases impliquées dans le processus de pénétration en s'attaquant à la cuticule et aux parois cellulaires, il s'agit d'une cutinase, d'une xylanase et d'une galacturonase ou pectinase (Tenhaken & Barz 1991, Bruns 1999). Sous l'effet de ces enzymes hydrolytiques, les parois cellulaires sont partiellement digérées, le cytoplasme se désorganise et des substances osmophiles s'accumulent sur le site de pénétration (Ilarslan & Dolar, 2002).

Le gène codant la cutinase de *A. rabiei* a été cloné et caractérisé, ce qui offre ainsi la possibilité de développer des mutants avec ce gène de la cutinase inactivé, pour confirmer que les enzymes dégradant la paroi cellulaire, sont des facteurs essentiels dans le mécanisme d'infection dans le pathosystème *A. rabiei/Cicer arietinum* (Tenhaken & *al.*, 1997).

### **b. Phytotoxines**

La principale caractéristique des champignons nécrotrophes tel *A. rabiei* est qu'ils tuent les tissus hôtes au cours de l'infection, généralement par la sécrétion entre autres de substances phytotoxiques (Huang, 2001 ; Stergiopoulos & *al.*, 2012). Les informations sur le mode d'action de ces substances constituent une étape importante

dans la compréhension de la susceptibilité aux maladies et du phénomène de résistance des plantes (Pandey & *al.*, 1987 ; Pande & *al.*, 2005 ; Tivoli & *al.*, 2006 ; Tivoli & Banniza 2007 ; Varejão & *al.*, 2013).

Des études histologiques de plants de pois chiches infectés par *A. rabiei* ont montré que, peu après l'expansion du pathogène dans les tissus sous-épidermiques, les cellules de l'hôte se trouvent déformées et leur structure se désintègre, de tels symptômes suggèrent l'implication de phytotoxines dans le processus infectieux de la maladie (Höhl & *al.*, 1990).

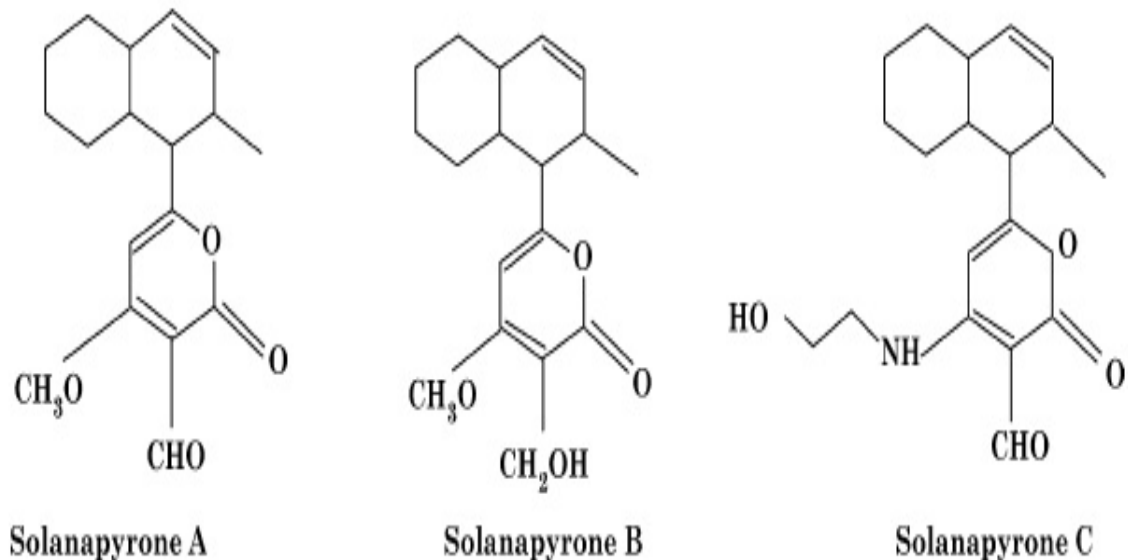
Trois toxines sont produites par *A. rabiei*, ces toxines sont les solanapyrones A, B et C (Figure 18). Il s'agit de toxines qui ont été isolées et caractérisées pour la première fois chez *Alternaria solani* ; agent de l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate (Hamid & Strange, 2000 ; Mogensen & *al.*, 2006 ; Zerroug & *al.*, 2007). D'après Höhl & *al.* (1990), l'application de solanapyrones purifiées sur des feuilles de pois chiche produit des symptômes visibles en 24 h, suivies de la contraction et de la plasmolyse des cellules épidermiques. Par ailleurs, Kaur (1995), relate qu'il existait une forte corrélation entre la production *in-vitro* de solanapyrones par différents isolats de *A. rabiei* et leur pouvoir pathogène. En plus des solanapyrones, la cytochalasine D est une autre phytotoxine qui est produite par *A. rabiei* (Latif & *al.*, 1993 ; Latif & *al.*, 1998 ; Dolar, 2010 ; Verma & *al.*, 2016). *A. rabiei* synthétise également d'autres toxines de nature protéique surtout, la plus citée est un polypeptide de 14  $\alpha$ -aminoacides conjugué à un fragment glycosidique et ayant un poids moléculaire de 7,6 kilodalton (Chen & Strange, 1994).

Parmi toutes ces toxines, la solanapyrone A est considérée comme la plus importante en jouant un rôle majeur dans la pathogénicité et la virulence de *A. rabiei* (Alam & *al.*, 1989 ; Chen & Strange, 1991 ; Hamid & Strange, 2000). Dans un bioessai confrontant *in-vitro* des cellules de pois chiche séparément aux trois solanapyrones, Shahid & *al.* (2008) sont arrivés à les classer par ordre décroissant de toxicité vis-à-vis des cultures cellulaires de pois chiche comme suit : solanapyrone A > solanapyrone B > solanapyrone C.

#### **II-2-4-6. Variabilité pathogénique**

La variation dans la réponse des différents germoplasmes et cultivars de pois chiche à l'égard de l'ascochytose et le comportement différentiel d'un même cultivar suivant l'endroit de culture a laissé suspecter l'existence d'une variabilité ou différentes races de *A. rabiei*, ces races sont qualifiées après comme pathotypes (Taylor & Ford, 2007 ; Atik & *al.*, 2013). La reproduction sexuée et la présence du téléomorphe (*D. rabiei*)

dans le cycle épidémique de l'ascochytose du pois chiche contribue amplement dans la variabilité au sein des populations du pathogène et la génération de nouveaux pathotypes résultant des combinaisons et de brassages de gènes de virulence (Hamza & *al.*, 2000 ; Jamil & *al.*, 2000 ; Pande & *al.*, 2005 ; Shahid & *al.*, 2008 ; Frenkel & *al.*, 2010).



**Figure 18 :** Structure des solanapyrones produites par *A. rabiei*. Bahti & Strange (2004).

La majorité des chercheurs s'accordent pour définir trois pathotypes de *A. rabiei*, à savoir le pathotype I, le pathotype II et le pathotype III (Jamil & *al.*, 2000 ; Chen & *al.*, 2004). Un autre pathotype baptisé pathotype IV est également signalé, il s'agit d'un pathotype capable de dévier la résistance du pois chiche appartenant aux lignées ICC-12004 et ICC-3996, considérées jusqu'alors comme des références en matière de résistance aux trois pathotypes déjà connus (Imtiaz, 2011).

#### **II-2-4-7. Réponse de l'hôte**

Les plantes évoluées ont développé des stratégies de défense très diversifiées qui leur permettent de résister aux agressions de la plupart des agents pathogènes (Strange, 2003 ; Mellersh & Heath, 2004). La résistance du pois chiche à l'ascochytose est déterminée par un ensemble de caractères anatomiques, biochimiques, physiologiques et génétiques. Le métabolisme de l'hôte s'opposant à l'invasion et le développement du pathogène, comprennent l'induction de l'hypersensibilité, le renforcement de la paroi cellulaire par dépôt de callose, de la lignine, d'acides cinnamiques, des polyphénols liés aux esters et des glycoprotéines riches en hydroxyproline et l'induction de phytoalexines et des protéines inhibant la croissance de l'agent pathogène ou réduisant sa virulence (Van Loon, 1999 ; Pataky & Carson, 2004 ; Pande et *al.*, 2005).

### **a. Caractères anatomiques**

Du point de vue anatomique et histologique, l'épaisseur de la cuticule des feuilles et celle des tiges ainsi que les cellules palissadiques constituent une barrière mécanique contre la pénétration des agents pathogènes (Talbot, 2004 ; Vidhyasekaran, 2008). Angelini et *al.*, (1993), rapportent qu'un nombre plus élevé d'éléments de xylème et de cellules parenchymatiques du xylème, ainsi qu'un épiderme et un hypoderme de tige plus épais caractérisent les génotypes résistants de pois chiche comparativement aux génotypes sensibles. Venora et Porta-Puglia (1993) et Sarwar et *al.* (1996), décrivent des parois cellulaires et des régions corticales plus minces chez le génotype sensible Aug 424 que celles des génotypes résistants.

### **b. Caractères physiologiques et biochimiques**

Beaucoup d'auteurs rapportent une corrélation positive entre la résistance du pois chiche à l'ascochytose d'une part et l'intensité respiratoire et la teneur en glucides totaux d'autre part (Dolar & Gurcan, 1995 ; Akem, 1999 ; Pande & *al.* 2005).

L'hypersensibilité chez les génotypes résistants se manifeste généralement par une augmentation de l'intensité respiratoire et la teneur en glucides totaux dès le deuxième jour succédant l'inoculation, en revanche un génotype sensible ne voit son intensité respiratoire et sa teneur en glucides augmenter qu'à partir du cinquième jour de l'inoculation. Par ailleurs, les teneurs en sucres réducteurs, en phosphore et en potassium augmentent davantage chez les génotypes résistants que chez les génotypes sensibles (Dolar & Gurcan, 1995 ; Khirbat & Jalali, 1999).

La plante hôte manifeste également d'autres réactions d'ordre biochimique suite aux attaques d'agents pathogènes, tel *A. rabiei*. Parmi les constituants du pois chiche intervenant dans sa réponse à l'ascochytose, il y a lieu de citer deux principaux composés phénoliques (isoflavones), la biochanine A (5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone) et la formononetine (7-hydroxy-4'-methoxyisoflavone).

Comparés aux génotypes sensibles de pois chiche, des génotypes résistants confrontés à *A. rabiei* ou à un filtrat brut de sa culture, accumulent davantage de composés phénoliques (Khirbat & Jalali, 1997 ; Pande & *al.*, 2005 ; Kanouni & *al.*, 2011). Kessmann et Barz (1986) relatent qu'un traitement de cotylédons de pois chiche par un filtrat brut d'une culture de *A. rabiei* augmente considérablement les niveaux de la biochanine A et de la formononetine.

### ***c. Pathogenesis Related Proteins (PRP) = Protéines Liées à la Pathogénèse***

En réponse aux attaques de pathogènes, les plantes ont développé une variété complexe de mécanismes de défense. Les protéines liées à la pathogénèse ou PRP pour *Pathogenesis Related Proteins* (PR-*Proteins*) en est l'exemple. Il s'agit d'un groupe de protéines diverses dont l'accumulation est déclenchée par une attaque d'agents pathogènes ou un stress abiotique (Van Loon, 1999 ; Coram & Pang, 2006).

Les PR-*Proteins* ont été classées en 12 groupes ou familles principaux. Certains d'entre elles présentent une activité antifongique, mais les fonctions de la plupart de ces protéines restent encore à élucider. Certaines d'entre elles sont connues pour être des  $\beta$ -1,3-glucanases (PR-2), des chitinases (PR-3) alors que d'autres sont considérées comme des perméabilisants des membranes fongiques (PR-5) (Collinge & *al.*, 1993 ; Honee, 1999 ; Hanselle & Barz, 2001 ; Coram & Pang, 2005). L'expression constitutive des PR-*Proteins*, pourrait conférer une sensibilité réduite à un groupe spécifique d'agents pathogènes (Bent & Yu, 1999 ; Van Loon, 1999 ; Ferreira & *al.*, 2007).

L'induction d'enzymes hydrolytiques de dégradation de la paroi cellulaire fongique et des enzymes catalysant la lignification de la paroi cellulaire joue un rôle important dans la résistance du pois chiche à l'ascochytose (Pande & *al.*, 2005). Nehra & *al.* (1994) rapportent que suite à une inoculation avec *A. rabiei*, l'activité de la chitinase dans les feuilles d'un génotype résistant a été multipliée par cinq au sixième jour après inoculation, par rapport à un témoin non inoculé. En outre, l'induction de la chitinase était également plus élevée dans des gousses infectées de génotypes résistants par rapport aux génotypes sensibles.

Les peroxydases, enzymes essentielles à la lignosubérisation, est également synthétisée davantage dans les parois cellulaires en réponse à l'invasion de pathogènes. L'activité de peroxydase dans les tiges de pois chiche augmente au cours de l'infection à *A. rabiei* avec une activité plus importante chez les génotypes résistants que chez les sensibles. Reste à signaler aussi que l'accumulation de la peroxydase et de la  $\beta$ -1,3-glucanase qui est une enzyme hydrolytique de la paroi cellulaire fongique, était plus élevée chez les génotypes résistants que chez les sujets sensibles, lorsqu'ils sont traités avec un filtrat brut d'une culture de *A. rabiei* (Vogelsang & Barz, 1990 ; Sindhu & *al.*, 1995).

### **II-2-5. Ascochytose du pois**

Tel est le cas pour l'ensemble des légumineuses alimentaires, l'ascochytose constitue également une des limites biotiques les plus importantes de la culture du pois. C'est une maladie à distribution mondiale et qui cause, partout où le pois est cultivé, des

pertes considérables, atteignant parfois les 70% en plus de la dépréciation de la qualité des gousses et des graines récoltées (Allard & *al.*, 1993 ; Bretag & *al.*, 1995a ; Bretag & *al.*, 2000 ; Tivoli & Banniza, 2007 ; Davidson & *al.*, 2013 ; Jha & *al.*, 2017 ; Saeed & *al.*, 2017)

### **II-2-5-1. Agent causal**

L'ascochytose du pois fait exception dans la mesure où elle est induite par un groupe de champignons pathogènes, chose qui la différencie des autres espèces légumineuses où l'agent causal est constitué d'une seule espèce de champignon pathogène (Tivoli & *al.*, 2006 ; Moussart & *al.*, 2007 ; Tran & *al.*, 2016). Cependant, sur pois elle est induite par trois champignons phytopathogènes étroitement apparentés, connus sous le nom de complexe ascochyta et qui inclue *Ascochyta pisi*, *Mycosphaerella pinodes* (anamorphe *Ascochyta pinodes*) et *Phoma medicaginis* var. *pinodella* communément appelé *Ascochyta pinodella* (Davidson & *al.*, 2011 ; Liu & *al.*, 2016 ; Sivachandra Kumar & Banniza, 2017). A cet égard, l'ascochytose du pois est considérée comme une maladie complexe car les trois agents pathogènes provoquent des symptômes plus ou moins similaires et se manifestent souvent ensemble (Muehlbauer & Chen, 2007), néanmoins chacune des trois espèces peut à elle seule causer la maladie (Fondevilla & *al.*, 2007 ; Onfroy & *al.*, 2007).

La littérature récente, australienne surtout, cite *Phoma koolunga* Davidson, Hartley, Priest, Krysinska-Kaczmarek, Herdina, McKay & Scott, comme une autre espèce causant, seul ou en association avec les trois espèces suscitées, l'ascochytose sur pois, mais cette espèce n'est signalée qu'en Australie et dont la présence reste limitée au sud-ouest de ce continent (Davidson & *al.*, 2009 ; Ahmed & *al.*, 2015 ; Barilli & *al.*, 2016 ; Khani & *al.*, 2016 ; Tran & *al.*, 2016 ; Tran & *al.*, 2017). D'autres espèces appartenant au genre *Phoma*, quoiqu'elle le soit à très faible degré comparativement à *P. koolunga*, sont également signalées comme associées à l'ascochytose du pois en Australie. Il s'agit de *P. glomerata* (Tran & *al.*, 2014b), *P. herbarum* (Li & *al.*, 2011) et *Boeremia exigua* var. *exigua* (Li & *al.*, 2012).

#### **a. *Mycosphaerella pinodes***

*Mycosphaerella pinodes* (Berk. & A. Bloxam.) Vestergren (téléomorphe) [syn. *Didymella pinodes* (Berk. & A. Bloxam) Petrak., syn. *Peyronellaea pinodes* (Berk. & A. Bloxam) Aveskamp, Gruyter & Verkley] anamorphe *Ascochyta pinodes* L. K. Jones est un champignon hemibiotrophe (Suzuki & *al.* 2017), il a été isolé chez *Pisum sativum*, *Lathyrus*, *Phaseolus* et *Vicia spp.* Le May & *al.* (2014) rapportent que ce champignon phytopathogène peut affecter en plus du pois, d'autres espèces légumineuses cultivées ou sauvages telles que la vesce, le trèfle, la luzerne et la féverole. L'ensemble des spécialistes le considère

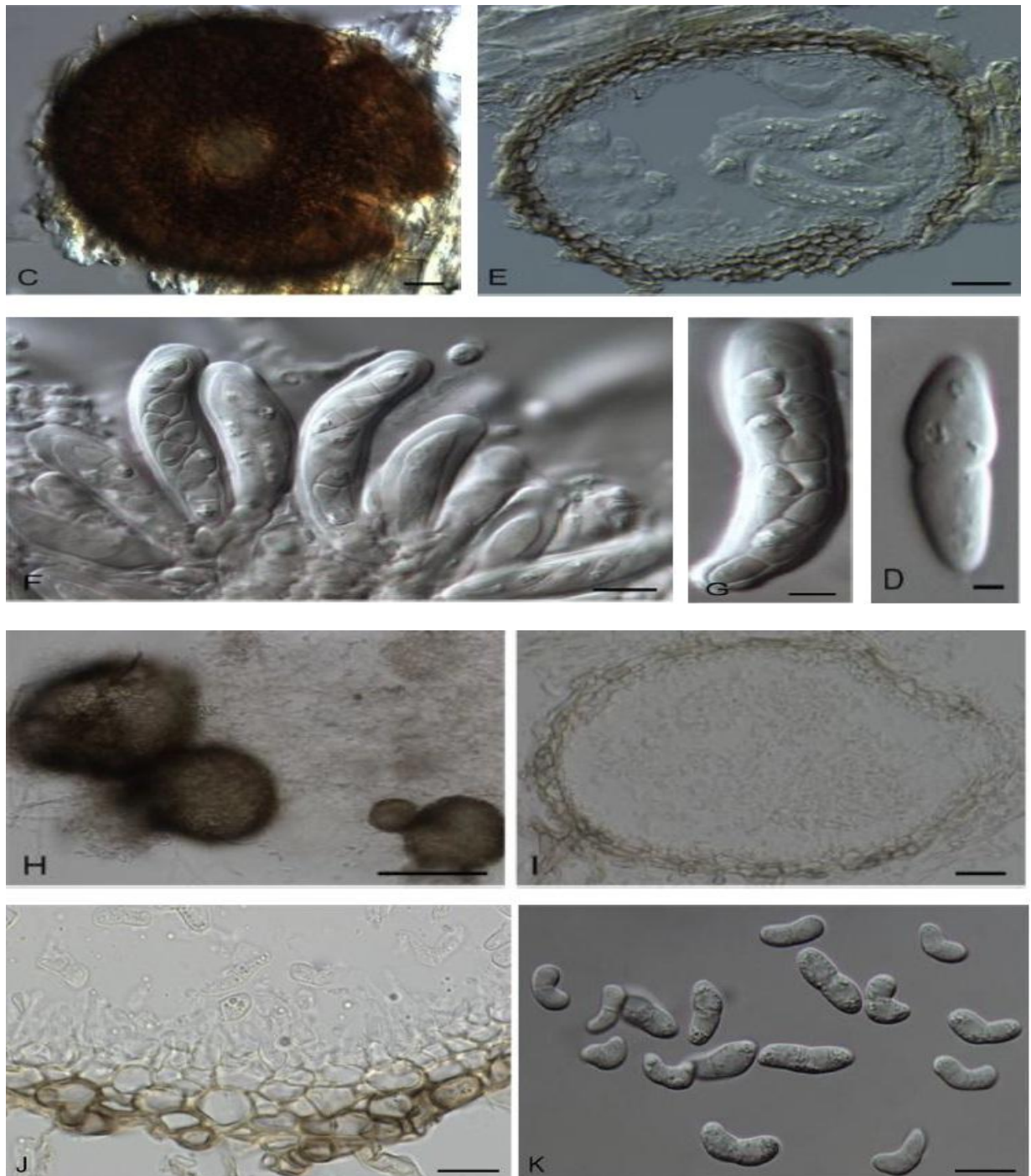
comme le pathogène le plus important parmi les espèces constituant le complexe ascochyta inféodé au pois (Kemal, 2002 ; Tivoli & Banniza, 2007 ; Tran & *al.*, 2014a ; Barilli & *al.*, 2016 ; Tran & *al.*, 2016).

Concernant la forme parfaite du champignon, Peever et *al.* (2007) lui ont suggéré l'appellation de *Didymella pinodes* Petrak, car la phylogénie des ITS (*Internal Transcribed Spacer*) a clairement démontré que *M. pinodes* n'est pas apparenté à *Mycosphaerella spp.* tels que *M. graminicola*, *M. fijiensis* et *M. punctiformis* ; espèces-types représentatives du genre *Mycosphaerella*, par contre elle le rapproche étroitement aux *Didymella spp.*, plus spécialement à *D. exegua* qui est considéré comme l'espèce-type du genre *Didymella*. Cependant l'appellation *D. pinodes* est de plus en plus adoptée par les mycologues et les phytopathologistes et commence à être largement citée dans la littérature la plus récente.

*D. pinodes* est homothallic (Barve & *al.*, 2003 ; Sivachandra Kumar & Banniza, 2017), il forme des pseudothèces de couleur brun foncé, globuleuses et mesurant 90 à 180  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les asques sont cylindriques à claviformes, à parois bituniquées et sessiles. Ils contiennent souvent huit ascospores bicellulaires et hyalines. Elles sont arrondies aux extrémités et mesurent 12 à 18 sur 4 à 8  $\mu\text{m}$  (Figure 19).

Dans sa reproduction asexuée, le champignon forme des pycnides brun foncé qui ont des parois plus épaisses que celles de *A. pisi* et de *P. medicaginis var. pinodella*. Au départ de leur genèse, les pycnides sont enfoncées dans les tissus de la plante hôte (tige, feuilles, gousses, graines), mais elles font surface à mesure qu'ils arrivent à maturité. Les pycniospores, qui mesurent 8 à 16 sur 3 à 5  $\mu\text{m}$ , sont généralement bicellulaires avec une constriction au niveau du septum (Figure 19), quoique rarement, les pycniospores puissent avoir deux septa (Richard & Boivin, 1994 ; Skoglund & *al.*, 2011 ; Davidson, 2012).

Contrairement à de nombreux champignons nécrotrophes, *D. pinodes* peut développer simultanément ses formes asexuées et sexuées sur la même plante pendant la saison de culture (Roger & Tivoli, 1996 ; Le May & *al.*, 2012). A cet effet, il est possible d'observer simultanément des pycnides (asexuées) et des pseudothèces (sexuées) sur les mêmes organes de la plante. Les pycnides sont produites à la fois sur les organes des plantes vertes et sénescents, alors que les pseudothèces n'apparaissent que sur les parties sénescents (Laloi & *al.*, 2016). Le champignon produit également des chlamydospores qui lui permettent de se conserver dans le sol (Bowen & *al.*, 1997 ; Tivoli & Banniza, 2007).



**Figure 19 :** *D. pinodes* (anamorphe *Ascochyta pinodes*) : (H) Pycnides, (I) Coupe d'une pycnide (J) Paroi pycnidiale (K) Pycniospores (C) Pseudothèce (E) Coupe d'une pseudothèce (F, G) Asques, (D) Ascospore. Barres: H = 100 µm; I = 20 µm; J–K = 10 µm; B = 200 µm; C, E = 20 µm; D = 2.5 µm, F = 10 µm, G = 5 µm. Chen & al. (2015).

### ***b. Phoma medicaginis var. pinodella***

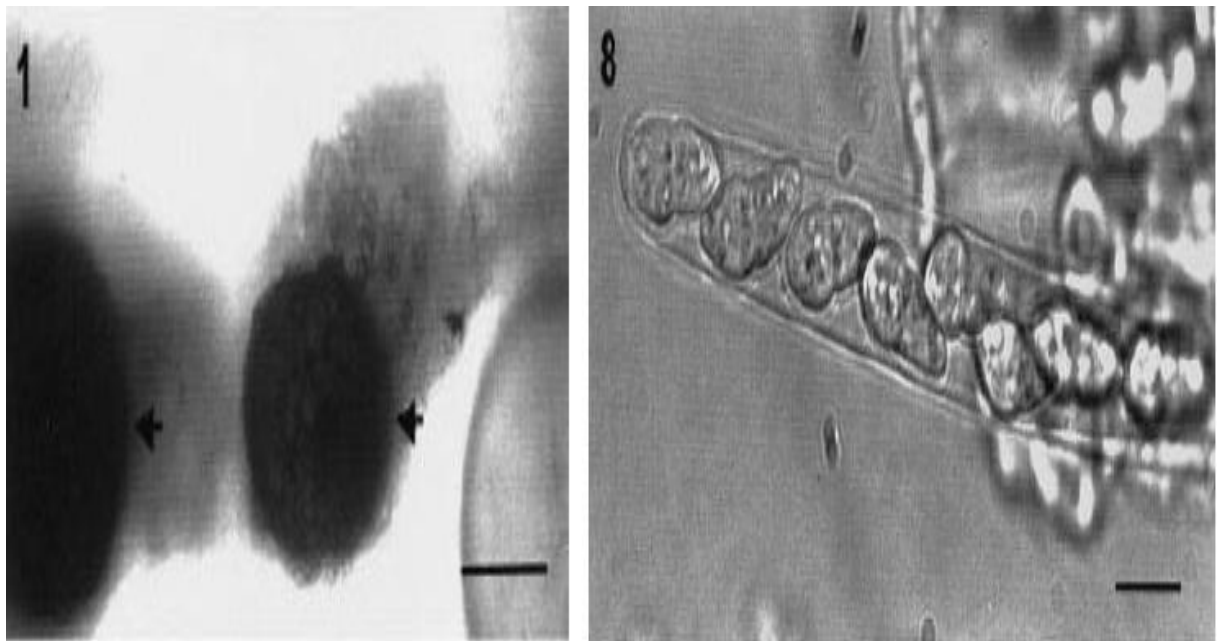
La littérature cite ce champignon comme *Phoma medicaginis* Malbranche & Roumeguère *var. pinodella* (L.K. Jones) Boerema (syn. *Ascochyta pinodella* L.K. Jones, syn. *Phoma pinodella* [L.K. Jones] (Morgan-Jones & K.B. Burch). Il est également cité sous le

nom de *Peyronellaea pinodella* (L.K. Jones) Aveskamp, Gruyter & Verkley (Aveskamp & *al.*, 2010 ; Baćanović-Šišić & *al.*, 2018).

Cet agent pathogène s'appelait à l'origine *Ascochyta pinodella* L.K. Jones (Bretag & *al.*, 2006 ; Irinyi & *al.*, 2009), tenant compte de la similarité de sa morphologie avec *Phoma medicaginis* Malbr. & Roum., il a été transféré dans le genre *Phoma*, en devenant *Phoma medicaginis* (Malbr. & Roum.) *var. pinodella* (L.K. Jones) Boerema (Aveskamp & *al.*, 2010). Morgan-Jones et Burch (1987) l'ont élevé au rang d'espèce, sous le nom de *Phoma pinodella* (L.K. Jones) Morgan-Jones & Burch, après avoir décelé des différences significatives et constantes avec l'espèce *P. medicaginis*, mais ce nom est très peu utilisé contrairement à la terminologie de *P. medicaginis var. pinodella* qui reste largement citée (Chen & *al.*, 2015 ; Chen & *al.*, 2017).

La forme parfaite de *P. medicaginis var. pinodella* a été mise en évidence pour la première fois par Bowen et *al.* (1997) sans qu'ils lui suggèrent un nom, mais ils observent que les pseudothèces, les asques et les ascospores produits sont fortement semblables à ceux de *D. pinodes* (Figure 20). Les mêmes auteurs avancent également qu'elle serait probablement hétérothallique.

Aveskamp et *al.* (2010), rapportent que du point de vue phylogénique le téléomorphe de cette espèce se rattacherait plausiblement au genre *Didymella*, alors que Chen et *al.* (2015) et Chen et *al.* (2017) dans deux études consacrées au genre *Phoma* et au *Didymellaceae* respectivement, la rapportent d'emblée comme étant *Didymella pinodella* (L.K. Jones) Q. Chen & L. Cai.



**Figure 20 :** *Phoma medicaginis var. pinodella*. (1) Pseudothèces indiquées par les flèches, (8) Asque contenant des ascospores. Bares : (1) = 20µm, (8) = 100 µm. Bowen & *al.* (1997).

Les pycnides de *P. medicaginis* var. *pinodella* sont globuleuses ou irrégulières et mesurant 96 à 320 µm de diamètre. Les pycniospores de taille moyenne de 4-7,5 x 2-3,5 µm, sont ovales à ellipsoïdales, principalement non-septées, pas moins de 80 ± 2% sur un lot de 200 selon Bowen et al. (1997) et lorsqu'elles le sont, elles sont uni-septées. Les chlamydospores abondamment produites, sont intercalaires ou terminales, solitaires ou en chaînes, en forme sub-globuleuses à sub-cylindriques et mesurent 8 à 20 µm de diamètre (De Gruyter, 2002 ; Boerema & al., 2004). Les pseudothèces sont globuleuses, brun foncé et de taille de 140-250 µm sur 170-420 µm (Figure 20-1). Les asques sont cylindriques à claviformes, à paroi bituniquée et mesurent 140-290 µm de longueur et 20-30 µm de largeur. Chaque asque contenait huit ascospores (Figure 20-8). Les ascospores de 12,5 à 19 µm, sont hyalines, ellipsoïdes, bicellulaires, rétrécies au niveau du septum et arrondies aux extrémités (Bowen & al., 1997).

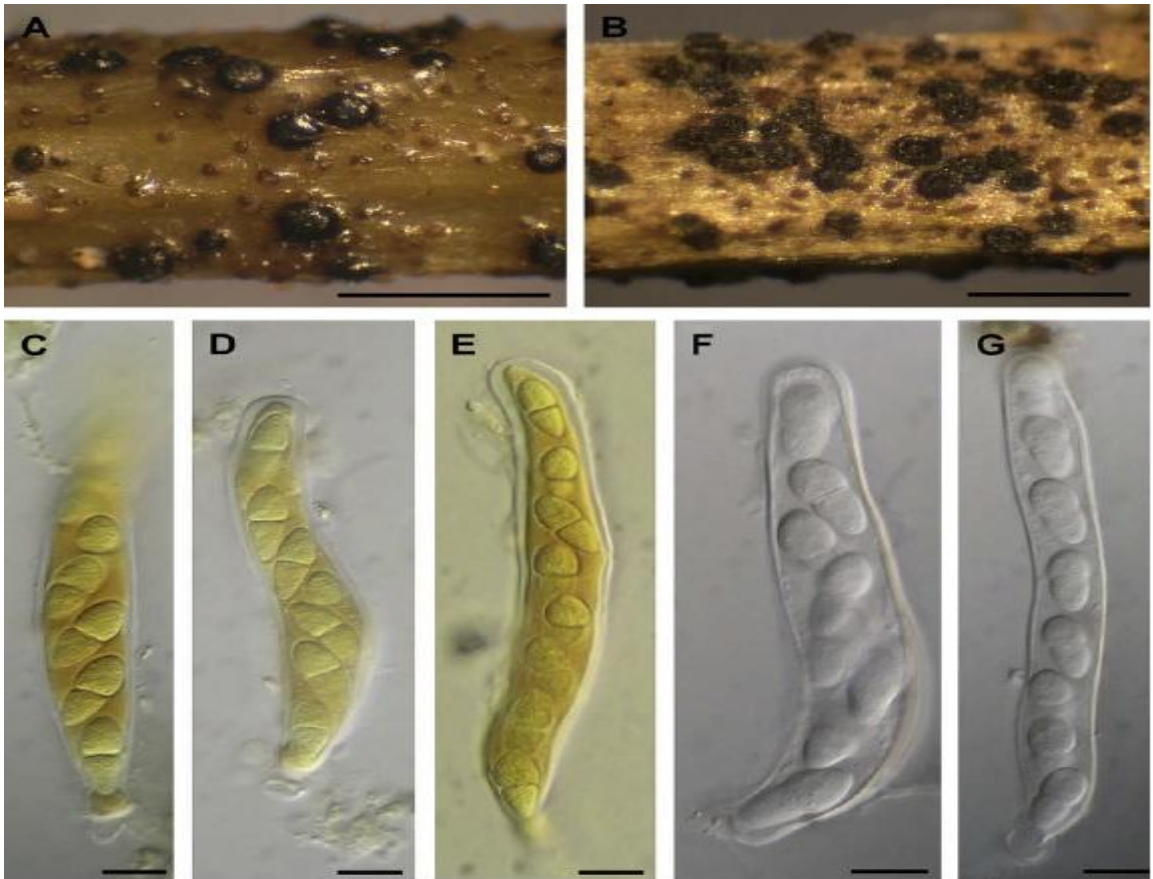
### **c. *Ascochyta pisi***

*Ascochyta pisi* Libert, dont le téléomorphe a été induit dans des conditions de laboratoire et décrit comme étant *Didymella pisi* sp. nov. M.I. Chilvers, J.D. Roger, F.M. Dugan, J.E. Stewart, W. Chen & T.L. Peever, est hétérothallique, impliquant ainsi deux mating types pour l'accomplissement de sa reproduction sexuée (Chilvers & al. 2009, Liu & al. 2013).

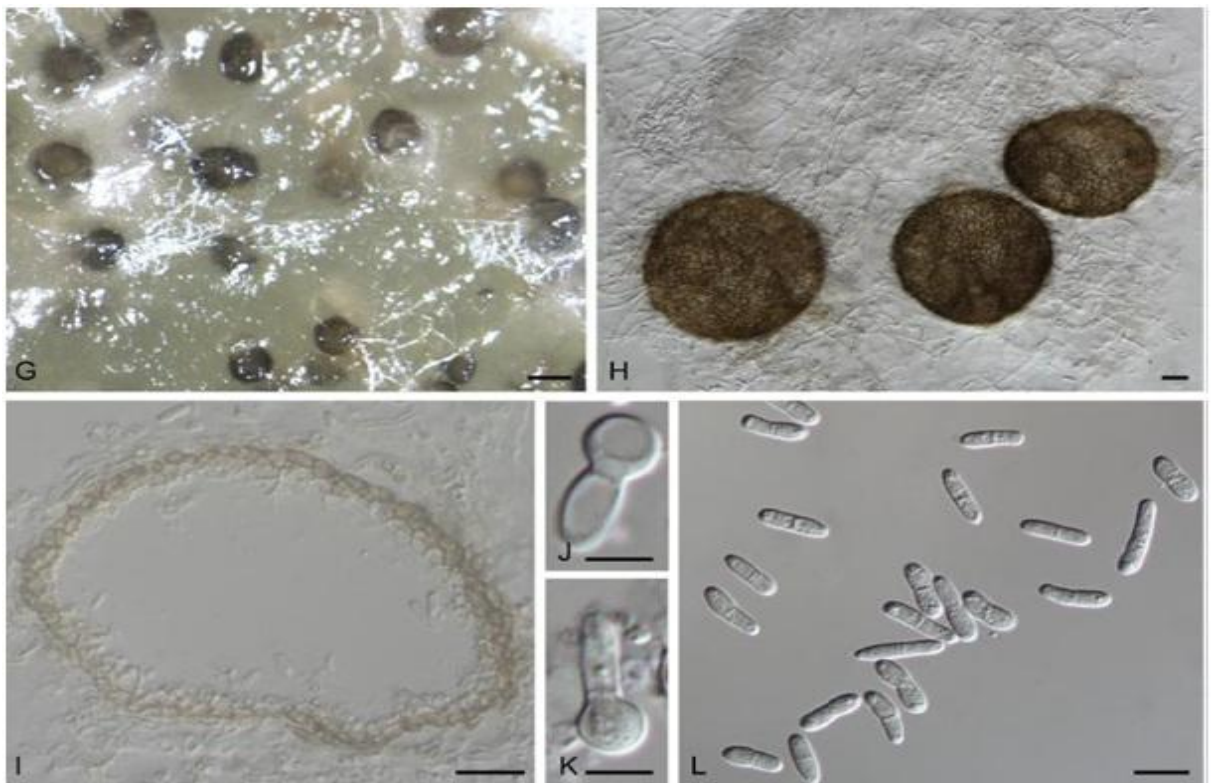
Dans le but d'approuver que la forme parfaite (Figure 21) de cette espèce, s'il existerait, doit être rattachée au genre *Didymella*, Hernandez-Bello & al. (2006) relatent qu'un croisement interspécifique dans des conditions de laboratoire entre *A. pisi* et *A. fabae* a conduit à la formation de pseudothèces (Figure 21) avec des ascospores viables et comparables à celles produites par des *Didymella* spp.

Contrairement à *A. pinodes* et *P. medicaginis* var. *pinodella*, *A. pisi* ne produit pas de chlamydospores (Navas-Cortes & al., 1995 ; Kraft & al., 1998 ; Fatehi & al., 2003). Ses pycnides sont de couleur brune, de forme globuleuse et de diamètre similaire à celles de *A. pinodes* à savoir 100 à 200 µm (Figure 22). Les pycnidiospores, qui mesurent en moyenne 10-16 x 3-4,5 µm, sont hyalines, droites à légèrement incurvées, aux extrémités arrondies et uni-septées avec une légère constriction au niveau du septum (Richard & Boivin, 1994 ; Davidson, 2012).

En plus du pois, Il a été rapporté que *A. pisi* infecterait une vingtaine de genre et plus d'une cinquantaine d'espèces de plantes, notamment *Glycine max*, *Lathyrus odoratus*, *Lens culinaris*, *Medicago sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Trifolium* spp. et *Vicia faba* (Farr & al., 2010 ; Skoglund & al., 2011).



**Figure 21 :** *Didymella pisi* Chilvers & al (anamorphe *Ascochyta pisi*) (A-B) Pseudothèces (grands corps noirs) et pycnides (petits corps) avant et après séchage respectivement, (C-E) Asques colorés à l'iode. (F-G) Asques montés dans l'eau. Barres : (A-B) 1 mm; (C-G) 10  $\mu$ m. Chilvers & al. (2009).



**Figure 22 :** *A. pisi* Libert. (G) Pycnides, (H) Pycnides, (I) Section d'une pycnide, (J-K) Cellules Conidiogènes, (L) Pycniospores. Barres: G=200 $\mu$ m; H-I=20 $\mu$ m; J-K=5 $\mu$ m; L=10 $\mu$ m. Chen & al. (2015).

**II-2-5-2. Taxonomie**

La classification des trois champignons du complexe ascochyta, responsables de l'ascochytose du pois est la suivante :

Source : <http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Page=200&ViewMode=Basic> (page consultée le 19/05/2019).

**a.** *Ascochyta pinodes* L. K. Jones (anamorphe) = *Mycosphaerella pinodes* (Berk. & A. Bloxam.) Vestergren (téléomorphe) = *Didymella pinodes* (Berk. & A. Bloxam) Petrak. (Téléomorphe).

- Règne : *Fungi*
- Phylum : *Ascomycota*
- Sous-phylum : *Pezizomycotina*
- Classe : *Dothideomycetes*
- Sous-classe : *Pleosporomycetidae*
- Ordre : *Pleosporales*
- Famille : *Didymellaceae*
- Genre : *Didymella*
- Espèce : *Didymella pinodes*

**b.** *Phoma medicaginis* Malbranche & Roumeguère var. *pinodella* (L.K. Jones) Boerema (anamorphe) = *Ascochyta pinodella* L.K. Jones (anamorphe) = *Phoma pinodella* (L.K. Jones) Morgan-Jones & K.B. Burch (anamorphe) = *Didymella pinodella* (L.K. Jones) Q. Chen & L. Cai (Téléomorphe).

- Règne : *Fungi*
- Phylum : *Ascomycota*
- Sous-phylum : *Pezizomycotina*
- Classe : *Dothideomycetes*
- Sous-classe : *Pleosporomycetidae*
- Ordre : *Pleosporales*
- Famille : *Didymellaceae*
- Genre : *Didymella*
- Espèce : *Didymella pinodella*

**c.** *Ascochyta pisi* Libert (anamorphe) = *Didymella pisi* M.I. Chilvers, J.D. Roger, F.M. Dugan, J.E. Stewart, W. Chen & T.L. Peever (téléomorphe).

- Règne : *Fungi*
- Phylum : *Ascomycota*
- Sous-phylum : *Pezizomycotina*

- Classe : *Dothideomycetes*
- Sous-classe : *Pleosporomycetidae*
- Ordre : *Pleosporales*
- Famille : *Didymellaceae*
- Genre : *Didymella*
- Espèce : *Didymella pisi*

### ***II-2-5-3. Interaction et coexistence des agents du complexe ascochyta***

Les trois agents pathogènes impliqués dans l'ascochytose du pois peuvent coexister et être isolés d'une même lésion sur feuilles, sur tiges ou sur gousses d'une même plante de pois (McDonald & Peck, 2009 ; Davidson & *al.*, 2012). Le type de relation entre les trois agents pathogènes du complexe ascochyta qui induisent la maladie fait encore défaut, mais semble impliquer une compétition interspécifique et éventuellement des optima climatiques différents, ainsi qu'une résistance différentielle des cultivars de pois à l'égard d'une espèce particulière du complexe (Tivoli & Banniza, 2007 ; Ahmed & *al.*, 2015). Une étude conduite par le May et *al.* (2009) dans le but de définir le type d'interaction et d'expliquer comment la coprésence de *M. pinodes* et *P. medicaginis var pinodella* sur le même organe de la plante hôte, le pois en l'occurrence, affecte le développement des pathogènes et la sévérité de l'ascochytose, il en ressortit que cette coprésence limite la reproduction des pathogènes et le développement de la maladie d'une part, d'autre part, les dommages dus à la maladie augmentent lorsque les plantes subissent des inoculations décalées dans le temps. En effet, la même équipe avance deux types de relations, synergisme et antagonisme suivant les conditions d'inoculation.

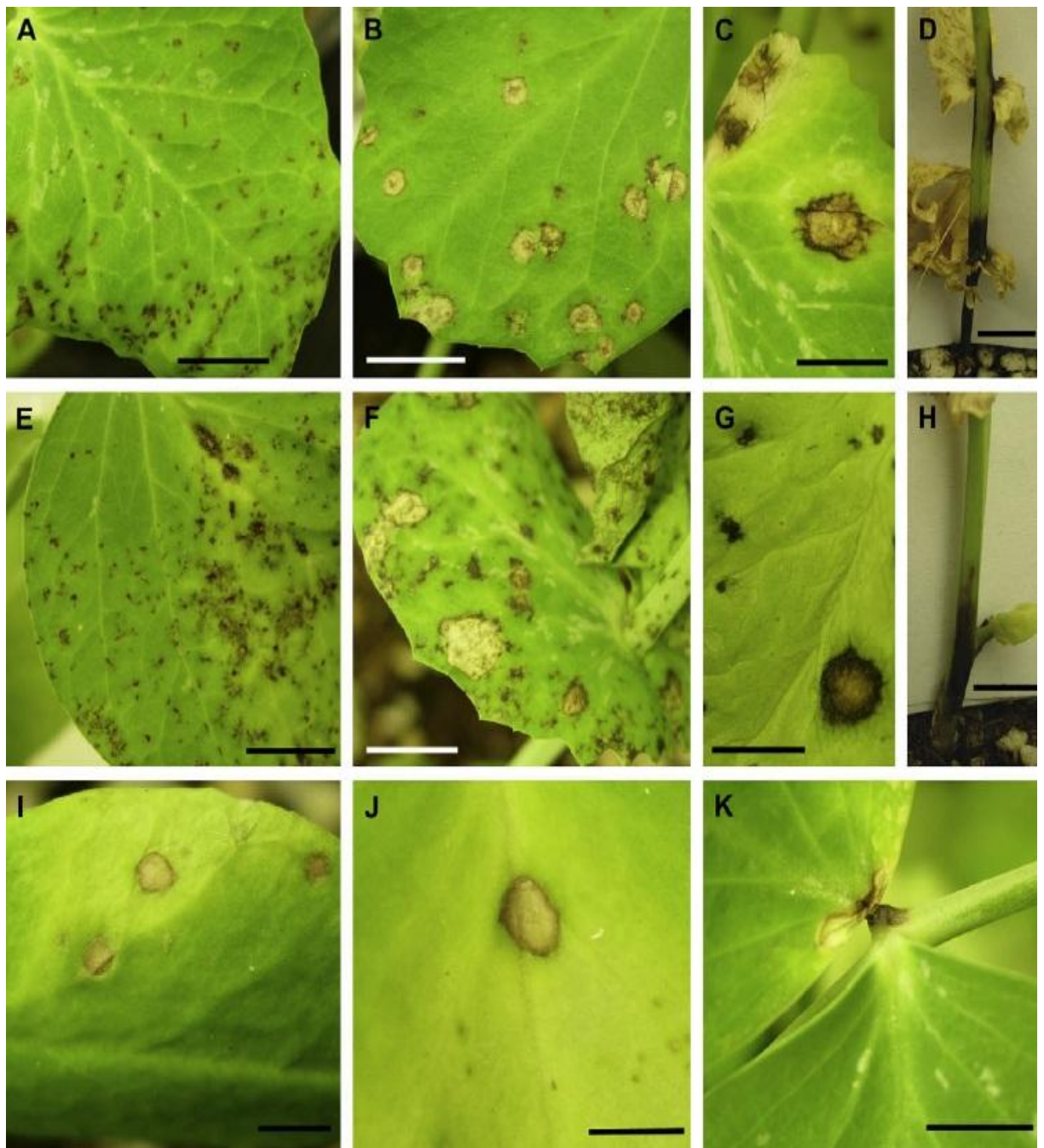
La prédominance d'une espèce du complexe par rapport aux autres varie surtout suivant la région. En Australie, Bretag et *al.* (1995b) ont observé que sur 436 lots de semences diagnostiqués, 94,8% des isolats étaient constitués de *D. pinodes*, 4,2% de *P. medicaginis var. pinodella* et 1,0% de *A. pisi*. Tivoli et Banniza (2007) rapportent que 85% des lots de semences canadiennes infectées l'ont été par *A. pisi*. Toutefois, depuis l'introduction au Canada de variétés de pois résistantes à *A. pisi*, *D. pinodes* a pris le dessus. En France, *D. pinodes* est l'agent pathogène dominant sur pois, mais dans le sud de la France, en Espagne et probablement en Afrique du Nord, c'est *A. pisi* qui prédomine parfois.

### ***II-2-5-4. Symptômes***

De même que sur fève, lentille et pois chiche, les symptômes de l'ascochytose sur pois se manifestent également sur les parties aériennes de la plante et qui consiste

grossièrement en des lésions nécrotiques ou taches sur feuilles (Figure 23), tiges et gousses, les nécroses sur ces dernières conduit souvent à une infection des graines (Gossen & *al.*, 2011 ; Tran & *al.*, 2016).

En plus des symptômes caractéristiques des *Ascochyta spp.*, *M. pinodes* et *P. medicaginis var. pinodella* provoquent un symptôme typique dit « *Foot rot* » (Bowen & *al.*, 1997 ; Onfroy & *al.*, 1999 ; Tivoli & Banniza, 2007 ; Khan & *al.*, 2013) A cet effet, les symptômes diffèrent sensiblement et sont à considérer alors suivant chacune des espèces du complexe pathogène.



**Figure 23 :** Lésions causées par les trois pathogènes du complexe ascochyta sur *Pisum sativum* cv. 'Lifter'. (A–D) *M. pinodes*, (E–H) *P. medicaginis var pinodella*, (I–K) *A. pisi*. Bars = 5 mm. Chilvers & *al.* (2009).

*A. pinodes* infecte les plantules et toutes les parties aériennes du pois, causant des taches nécrotiques foliaires, des lésions sur les tiges, un rétrécissement et une décoloration vers un brun foncé des graines, un noircissement de la base de la tige et un «*foot rot*». Les symptômes causés par *P. medicaginis* var. *pinodella* sont similaires à ceux observés avec *A. pinodes*. En revanche, *P. medicaginis* var. *pinodella* peut entraîner un «*foot rot*» plus grave, qui s'étend souvent à la partie souterraine tout en causant moins de dommages sur feuilles, tiges et gousses. *A. pisi* provoque des lésions sur feuilles, tiges et gousses légèrement enfoncées, circulaires, de couleur bronzée, avec des marges brun foncé (Bretag & al., 2006 ; Chilvers & al., 2009 ; Liu & al., 2016).

#### **a. Symptômes dus à *A. pinodes***

L'infection due à *A. pinodes* entraîne au début l'apparition de petites taches pourpres sur les feuilles. A défaut d'humidité favorable, celles-ci restent petites et sans marges définies, tandis qu'en conditions humides, elles s'agrandissent et virent du brun au noir, en prenant des marges définies et souvent une apparence zonée. En cas de fortes attaques, les feuilles peuvent être totalement nécrosées tout en restant attachées à la plante. Les lésions sur tige sont de couleur similaire que celles sur feuilles mais plus allongées, après elles deviennent progressivement plus longues et souvent elles fusionnent pour ceinturer complètement la tige et donner à la partie inférieure un aspect bleu-noir. Lorsque les fleurs sont infectées, de petites lésions ponctuelles apparaissent sur les fleurs ce qui provoque la chute de la fleur ou de la petite gousse, ou déforme la gousse survivante et limite la production de graines (Roger & al., 1999a ; Bretag & Ramsey, 2001). Les symptômes sur graines se caractérisent souvent par un rétrécissement et une coloration brun foncé. Après semis, la propagation de l'infection des semences aux plants en formation provoque le «*foot rot*», en partant du point de fixation des semences et en progressant sur la tige ou l'hypocotyle et le long de la racine pivotante ou l'épicotyle (Figure 24). Une infection grave peut retarder la croissance ou tuer les jeunes plantules. Lorsque les plantes approchent de la maturité, une infection générale grave provoque la sénescence de toutes les feuilles inférieures et le noircissement des tiges à la base de la plante (Clulow & al., 1991 ; Clulow & Lewis, 1992 ; Richard & Boivin, 1994 ; Davidson, 2012).

#### **b. Symptômes dus à *P. medicaginis* var *pinodella***

Les symptômes causés par *P. medicaginis* var. *pinodella* sont très semblables à ceux dus à *A. pinodes*. Néanmoins, les nécroses sur feuilles, tiges et gousses sont moins accentués et provoque moins de dommages, contrairement au «*foot rot*» qui est

généralement plus grave que celui dû à *A. pinodes* et peut s'étendre en atteignant les racines (Persson & *al.*, 1997 ; Bretag & *al.*, 2006). Baćanović-Šišić & *al.* (2018) relatent que sur des plants de pois atteints de «*foot rot*», *P. medicaginis* var. *pinodella* avait une fréquence d'isolement longeant les 86%.



**Figure 24** : Le *foot rot* causé par *M. pinodes* sur épicotyle et racines. Tran (2017).

### ***c. Symptômes dus à A. pisi***

*A. pisi* est considérée comme la moins dommageable comparativement aux autres espèces du complexe ascochyta (Chilvers & *al.*, 2009). Les nécroses causées par *A. pisi* sur feuilles, tiges et gousses sont semblables à celle causées par *A. rabiei* et *A. lentis* sur pois chiche et lentille respectivement (Peever & *al.*, 2007). Elles sont légèrement enfoncées que celles causées par les deux autres espèces du complexe ascochyta et laissent apparaître des pycnides noires arrangées en cercles concentriques. Les marges des lésions sont bien délimitées et de couleur brun foncé. Sur tiges les lésions sont allongées alors que, sur feuilles et gousses elles sont bien arrondies (Figure 25). Contrairement à *A. pinodes* et *P. medicaginis* var. *pinodella*, *A. pisi* attaque rarement la base de la plante et ne cause pas de «*foot rot*» (Davidson, 2011 ; Tran 2017).



**Figure 25** : Lésions nécrotiques dues à *A. pisi*. (B) sur tige, (C) sur gousses. Sivachandra Kumar (2016).

### II-2-5-5. Epidémiologie

#### a. Facteurs influençant le développement de la maladie

Les conditions climatiques, humidité et température en particulier, sont les principaux facteurs conditionnant la gravité de l'ascochytose sur pois, l'apparition des symptômes ou durée d'incubation et le développement de nouvelles propagules reproductives ou durée de latence (Roger & Tivoli, 1996 ; Suffert & Thompson, 2018). A 20° C, la production des pycnides dure en moyenne 3 à 4 jours, alors qu'elle peut durer 8 jours pour des températures plus élevées ou plus basses et des périodes humides plus longues. Pour des températures oscillant entre 5 et 20 ° C, le nombre de pycnides sur les feuilles augmentait, en revanche, ce nombre diminuait entre 20 et 30° C (Roger et *al.*, 1999a).

Bretag et *al.* (2006) rapportent que sur un milieu artificiel, une température de 16° C est optimale pour le développement à la fois de pycnides et de pseudothèces, *in-planta*, la formation et la maturation de pseudothèces a lieu 13 à 14 jours à partir du début de l'infection. En plus de la température, l'humidité est également cruciale. Cependant, la pluviométrie et les taux d'humidité proches du point de rosée sont considérés comme très favorables à la fois pour la formation d'ascospores et la libération des pycniospores par les pycnides (Roger & *al.*, 1999b ; Zhang & *al.*, 2005 ; Schoeny & *al.*, 2007).

La température et l'humidité influencent fortement la germination des ascospores et des pycnidiospores. Dans des conditions sèches, ces dernières peuvent survivre trois semaines sans qu'elles perdent leur pouvoir infectieux (Roger & *al.*, 1999b). À 10° C, une période humide de 12 heures est nécessaire pour que les conidies germent et

l'infection ait lieu sur feuilles, alors qu'il suffisait que 6 heures si les températures avoisinent les 20° C. Pour la même température, l'intensité des symptômes et la gravité de la maladie augmentent fortement si la période humide passe de 6 à 12 heures. Après l'infection, c'est la température qui continue à jouer un rôle important dans le développement de la maladie (Bretag & Ramsey, 2001 ; Bretag & *al.*, 2006). Roger et *al.* (1998) et Roger et *al.* (1999a), relatent que la température optimale pour le développement de la maladie est de 20° C, toutefois un développement rapide peut avoir lieu à une gamme plus large de température allant de 15 à 25° C (Tableau 4).

**Tableau 04 :** Synthèse des effets d'une période sèche et/ou humide sur le développement de la maladie causée par *D. pinodes* à des températures de 5 à 30° C. Adapté de Roger et *al.* (1998).

| Humidité | Étapes de l'infection |                            |   | Intensité de la maladie*                |
|----------|-----------------------|----------------------------|---|---|
|          | Germination           | Formation des appressoria  | Pénération                                |   |
| PS       | Pas de développement  |                            |   |   |
| PHC      | 2heures (15-30° C)    | 4-8heures (15-25° C)       | 8-24heures (15-25° C)                     | Fortes >4,5 (après 8jours d'incubation) |
|          | 6-24heures (5-10° C)  | 48-72heures (5, 10, 30° C) | 48-72heures (5, 10, 30° C)                | Faibles <3 (après 8jours d'incubation)  |
| PH-PS    | Pas de symptômes      | Intensité <2               | Intensité de la maladie <3 (15-25° C)     | Fortes >4,5 (après 8jours d'incubation) |
|          |                       |                            | Intensité de la maladie <1 (5, 10, 30° C) | Faibles <3 (après 8jours d'incubation)  |

**PS :** période sèche après incubation

**PHC :** période d'humidité continue ; durée minimale pour l'initiation de l'infection après contamination par *D. pinodes* et intensité de maladie après huit jours d'incubation.

**PH-PS :** alternance de période humide et de période sèche survenant au cours des différentes étapes de l'infection ou lorsque les symptômes apparus ; niveau de maladie après huit jours de période sèche.

\* Suivant une échelle de 0 à 5.

La vitesse de développement de la maladie est également sous la dépendance du niveau d'inoculum, à températures équivalentes, des faibles niveaux d'inoculum tel est souvent le cas de l'inoculum primaire, l'apparition des symptômes est tardives, en revanche, des niveaux plus élevés d'inoculum qui surviennent après plusieurs cycles infectieux (inoculum secondaire), les premiers symptômes apparaissent généralement dans les 24 heures succédant l'inoculation, et ceci pour des températures oscillant entre 15 et 25° C (Roger & *al.*, 1998).

### **b. Cycle de la maladie**

Hormis *A. pisi* pour lequel une forme parfaite n'a pas encore été observée sur champ, les cycles épidémiques des espèces fongiques composant le complexe ascochyta, se confondent (Peever & al., 2007). Les trois agents pathogènes responsables de l'ascochytose du pois sont considérés comme des champignons séminicoles, ils peuvent ainsi survivre et être désimés et transmis par les semences, ils peuvent également survivre sur les chaumes issus des cultures de pois, les repousses et les légumineuses sauvages. En plus, *D. pinodes* et *P. medicaginis* var. *pinodella* survivent également dans le sol sous forme de sclérotés et de chlamydospores contrairement à *A. pisi* qui n'a pas de stade dormant dans le sol (Tivoli & al., 1996 ; Bretag & al., 2006 ; Tivoli & Banniza, 2007).

Roger et al. (1998), énumèrent quatre principales sources d'inoculum primaire : (i) le sol, source qui concerne *D. pinodes* et *P. medicaginis* var. *pinodella* qui ont la capacité de produire et de se conserver sous forme de chlamydospores, (ii) Les débris de récoltes contaminés et non enfouis qui peuvent servir de support aux périthèces dont les ascospores disséminées par le vent contaminent les nouvelles plantules, (iii) Les légumineuses sauvages et les repousses spontanées de plantes de pois sur lesquelles le parasite se conserve ; (iv) les semences infectées qui déclenchent la maladie sur les nouvelles plantules. Selon Moussart et al. (1998), l'inoculum séminicole n'intervient que dans l'initiation de la maladie et non pas dans l'épidémie, mais une forte infection des semences par *D. pinodes* et *P. medicaginis* var. *pinodella* conduit directement au symptôme de « foot rot » et pouvant entraîner la mort des jeunes plantules. Toutefois une forte charge de *D. pinodes* provoque parfois des fontes de semis des graines responsable d'un manque important à la levée.

L'ascochytose du pois est une maladie polycyclique (Figure 26), une fois initiée, de nouvelles pycnides et pseudothèces sont alors produites. Ces propagules assurent ensuite l'inoculation secondaire et de nouveaux cycles infectieux se succèdent (Davidson, 2012 ; Bretag & Ramsey, 2001). Des pseudothèces, des ascospores sont éjectées et transportées par le vent sur de longue distance; ainsi elles peuvent être propagées sur de grandes surfaces. Les ascospores sont libérées en conditions sèches, mais des taux élevés d'humidité tels que ceux que l'on trouve dans les couverts végétaux denses favorisent leur germination. Plusieurs générations de spores peuvent être produites durant une saison de culture, à partir de feuilles malades à des intervalles de deux semaines ou plus (Richard & Boivin, 1994). Les conidies à leur tour, sont expulsées des pycnides sous forme d'une matrice gélatineuse et disséminées par les éclaboussures de

pluie ou par les gouttelettes transportées par le vent. Des tubes germinatifs sont émis et pénètrent directement la cuticule et les parois cellulaires.

Les symptômes causés par *D. pinodes* et *P. medicaginis* var. *pinodella* apparaissent après deux à quatre jours et ceux causés par *A. pisi* après six à huit jours. La production abondante de pycnides au niveau des lésions libère plus de conidies, ce qui favorise ainsi la propagation de la maladie en conditions humides (Bretag & al., 2006 ; Schoeny & al., 2007 ; Schoeny & al. 2008).

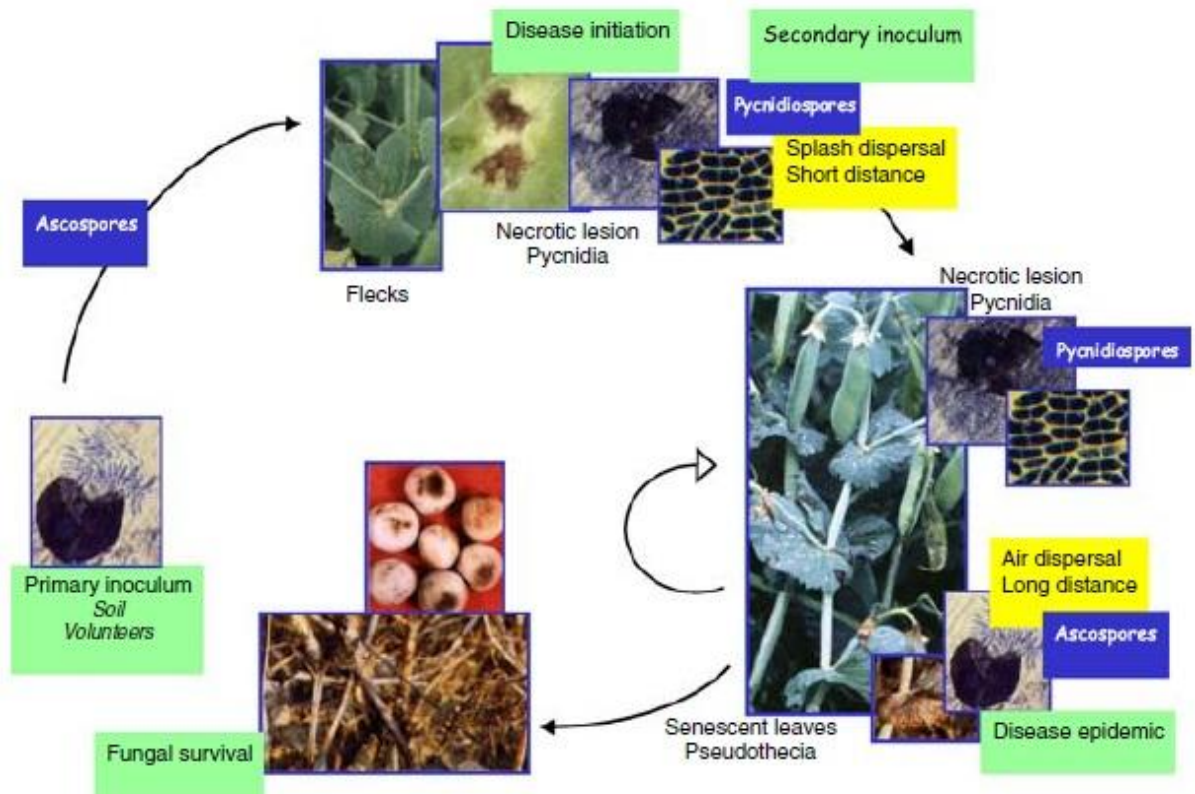
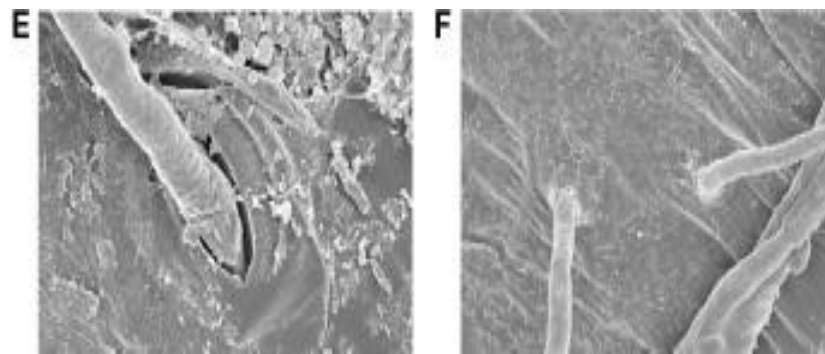


Figure 26 : Cycle épidémique de l'ascochytose du pois causée par *D. pinodes*. Tivoli et Banniza (2007).

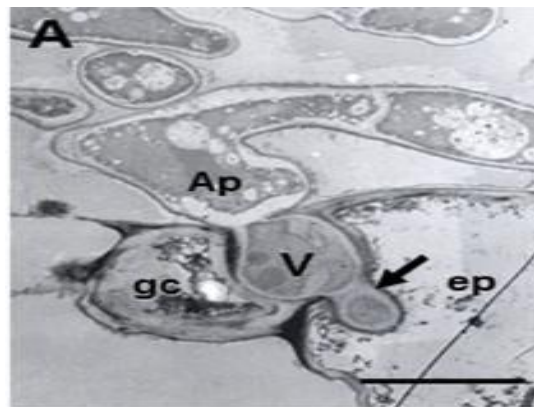
### II-2-5-6. Processus infectieux

La germination des spores marque le déclenchement du processus infectieux, des tubes germinatifs sont alors émis et la pénétration (Figure 27) s'effectue soit directement à travers la cuticule ou via les stomates (Wroth, 1998 ; Liu & al., 2016). Clulow et al. (1991) décrivent deux phases distinctes dans le processus infectieux par *D. pinodes* ; une phase biotrophe dans laquelle des appressoria se développent à travers la paroi externe de l'épiderme, pénétrant parfois dans les cellules sans provoquer de nécrose. Cette phase est suivie par une autre phase nécrotrophe impliquant une nécrose progressive.

Les conidies de *D. pinodes* émettent un ou plusieurs tubes germinatifs, qui se ramifient fréquemment et forment des appressoria à la surface de la feuille et du cotylédon 6 heures après l'inoculation et la pénétration se produit à travers les parois de l'épiderme 8 heures après inoculation (Roger & *al.*, 1999a). Une vésicule infectieuse émerge à la pointe de l'appressorium (Figure 28), située en partie dans la paroi de l'épiderme et en partie dans la lumière des cellules (Suzuki & *al.*, 2017). À partir de là, un hyphe de pénétration apparaît et initie des hyphes inter et intracellulaires. La colonisation se produit alors et sera suivie rapidement d'un effondrement des tissus et d'un brunissement des cellules atteintes (Nasir et *al.*, 1992).



**Figure 27 :** Micrographie électronique à balayage de la pénétration de *D. pinodes*. (E) Pénétration via le stomate, (F) Pénétration directe. Liu & *al.* (2016).



**Figure 28 :** Micrographie électronique à transmission des structures infectieuses de *D. pinodes*. (Ap) Appressorium, (V) Vésicule infectieuse, (gc) Cellule de garde, (ep) Cellule épidermique. Bare : 5µm. Suzuki & *al.* (2017).

### ***a. Rôle des enzymes***

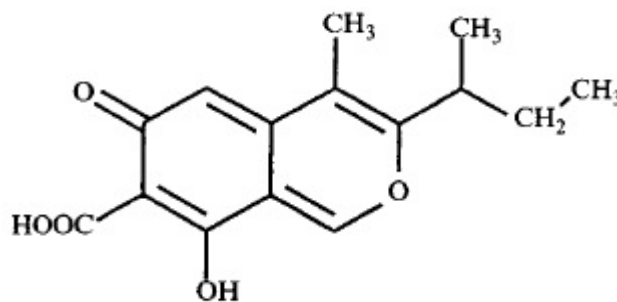
Les trois champignons du complexe ascochyta affectant le pois sont capables de produire des enzymes dégradant les parois cellulaires de la plante hôte, ces enzymes leur permettent la dégradation de la cellulose pariétale surtout et elles pourraient être importantes à la fois pour la pathogénicité et la survie de ces champignons en tant que saprophytes (Anderson & Powelson, 1979 ; Liu & *al.*, 2016 ; Suzuki & *al.*, 2017). *A. pisi* et

*D. pinodes* produisent des polygalacturonases, des amylases, des peptidases et des invertases. *M. pinodes* semble avoir une activité cellulolytique et pectinolytique plus intense que celle développée par *A. pisi*, ce qui explique peut-être le fait que les lésions nécrotiques associées à *D. pinodes* sont plus grandes (Bretag & al., 2006).

### **b. Rôle des toxines**

Parmi les trois espèces du complexe *ascochyta*, c'est *A. pisi* qui est le plus cité comme toxigène en produisant un métabolite doté de pouvoir phytotoxique. C'est en 1980 que Kaur et Deshpande ont isolé un composé thermostable à partir de cultures de *A. pisi* et ont montré qu'il pouvait provoquer des brûlures sur feuilles de pois. Ce composé (Figure 29) dont le rôle est avéré dans le processus infectieux de l'ascochytose du pois est nommé ascochitine (Beed & al., 1994 ; Hwang & al., 2004).

Des études menées par Lepoivre (1982) ont montré que le pouvoir pathogène des isolats de *A. pisi* était en corrélation avec leur capacité à produire *in-vitro* de l'ascochitine. Selon Kaur et Deshpande (1980), l'ascochitine agit en perturbant essentiellement la perméabilité transmembranaire des cellules qui terminent par perdre leur contenu. Lepoivre (1982) et Huang (2001) en décrivant le mode d'action, ils rapportent qu'en dépit des taches nécrotiques provoquées par un traitement de feuilles détachées à l'ascochitine, des disques de feuilles de pois trouvent également leur perméabilité augmentée lorsqu'ils sont traités avec une solution de 100µg/litre d'ascochitine. Quoique son rôle dans la maladie ne soit pas encore établi, l'ascosalitoxine est une autre toxine synthétisée par *A. pisi*. Cette substance était considérée à tort comme précurseur de l'ascochitine (Evidente & al., 1993a ; Strange, 2006).



**Figure 29** : L'ascochitine (C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>). Beed & al. (1994).

Huang (2001) rapporte que *D. pinodes* produit lui aussi une phytotoxine dite pinolidoxine (Figure 30). Evidente et al. (1993b), sans qu'ils décrivent son mode d'action et sans rôle dans l'ascochytose du pois, ils relatent qu'elle était hautement phytotoxique à l'égard d'un hôte de *D. pinodes* (pois) et d'un non-hôte (haricot).

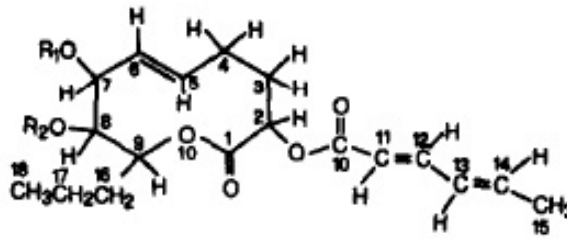


Figure 30 : La pinolidoxine. Evidente *et al.* (1993b).

Hwang *et al.* (2004) mettent en évidence d'autres métabolites sécrétés par *D. pinodes* et ils proposent la formule générale  $C_{16}H_{12}N_3O_6$  pour le plus important d'entre eux. Les mêmes auteurs notent également que le traitement de disques de feuilles de pois avec ce métabolite, provoque une décoloration des zones traitées, ce qui laisse supposer qu'il pourrait avoir une part dans la pathogénicité de *D. pinodes*.

## II-2-5-7. Réponse de l'hôte

### a. Les phytoalexines

En plus des caractères anatomiques de défense propres à l'ensemble des végétaux dont la cuticule et les parois cellulaires qui constituent les premières barrières qui s'opposent à la pénétration des pathogènes, les plantes déploient d'autres mécanismes de défense de nature chimique (Talbot, 2004 ; Ferreira & *al.*, 2007). Ces mécanismes se manifestent surtout à travers la synthèse de phytoalexines, dont l'induction est assurée par des éliciteurs endogènes et/ou exogènes (Purkayastha, 1996 ; Thakur & Sohal, 2013). A cet effet, il a été rapporté que la synthèse de la pisatine (Figure 31), qui est une phytoalexine (isoflavonoïde) du pois, est liée à sa résistance aux maladies (Bretag & *al.*, 2006 ; Vermerris & Nicholson, 2006).

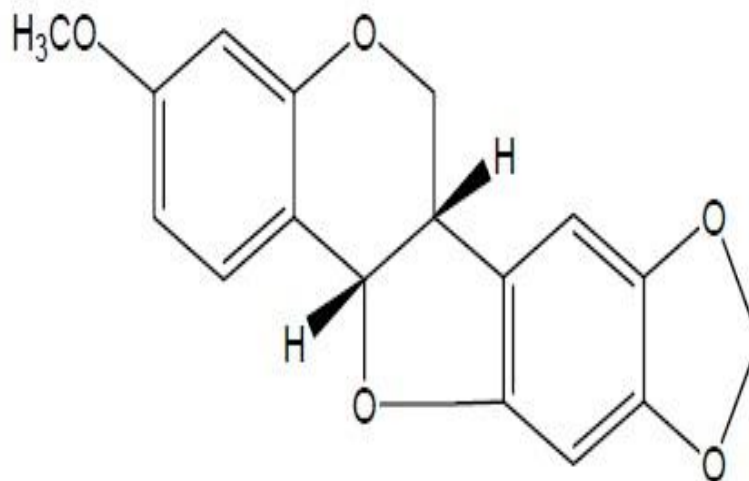


Figure 31 : La pisatine. Vermerris et Nicholson (2006).

Lorsque le pois subit les attaques de *D. pinodes* ou *A. pisi*, la concentration de la pisatine augmentent dans le cas de taches nécrotiques limitées, alors que cette concentration est beaucoup plus faible dans le cas de taches diffuses et étalées (Amit & *al.*, 2002). Tivoli et Banniza (2007), rapportent que les concentrations de la pisatine diminuaient avec la sénescence des plantes de pois alors que le tissu devenait plus susceptible à l'infection par *M. pinodes*, un tel constat à laisser Roger et Tivoli (1996) conclure que tout facteur contribuant à une diminution de la concentration de la pisatine et à une sénescence accélérée des plantes pouvait favoriser *D. pinodes* à produire des pseudothèces. En revanche, l'humidité excessive des feuilles favorise probablement le développement des pycnides en raison d'une dilution de la pisatine selon Roger et *al.* (1999a).

Bretag et *al.* (2006), relatent que les agents pathogènes composant le complexe ascochyta manifestent une tolérance différentielle à l'égard de la pisatine et leur pouvoir pathogène réside entre autre dans leur capacité à dégrader la pisatine. *M. pinodes* produit un éliciteur et un suppresseur de la production de la pisatine au niveau des feuilles de pois (Kiba & *al.*, 1996) et sa pathogénicité peut résulter de la suppression de l'induction de la pisatine. Le suppresseur produit par *M. pinodes* empêche la production de la pisatine et semble empêcher l'expression de la résistance de la plante hôte, tandis que l'éliciteur favorise la formation de la pisatine, augmentant ainsi la résistance de l'hôte (Shiraishi & *al.*, 1983).

### **b. Les chitinases**

Les plantes réagissent aux attaques de micro-organismes pathogènes en induisant l'expression d'un grand nombre de gènes codant pour diverses protéines, dont beaucoup auraient un rôle dans la défense (Bol et *al.*, 1990 ; Coram & Pang, 2006). Parmi les gènes induits, on trouve ceux codant pour les chitinases qui sont considérées comme des PR-*Proteins* (Honee, 1999 ; Van Loon, 1999 ; Coram & Pang, 2005).

Les chitinases ont été décrites et caractérisées pour un grand nombre d'espèces végétales. Elles présentent un intérêt particulier dans les études de résistance des plantes aux agents pathogènes fongiques, car leur substrat naturel est présent dans les hyphes fongiques mais absent chez les plantes.

Ces enzymes ont comme substrat la chitine, un composant majeur des parois cellulaires fongiques (Linthorst, 1991 ; Dickinson, 2003). L'activité de la chitinase dans les plantes peut être induite non seulement par une infection par des agents pathogènes, mais également par des éliciteurs isolés des parois cellulaires fongiques ou par des substances

apparentées à la chitine telles que le chitosane (Mauch & *al.*, 1988a ; Collinge & *al.*, 1993 ; Thakur & Sohal, 2013).

Vad et *al.* (1991), constatent que l'activité de la chitinase augmente dans des feuilles de pois suite à leur inoculation que se soit par des isolats virulents ou avirulents de *A. pisi*. Cependant les mêmes chercheurs ont pu séparer et identifier chez le pois trois classes de chitinases A1, A2 et B, les chitinases A1 et A2 avaient un PM (poids moléculaire) avoisinant les 34 kilodalton (kDa) et un pHi de 8,5 alors que la B est de PM de 25 kDa et un pHi de 9. Dans la même étude il a été constaté que 150 heures après inoculation, les niveaux des chitinases augmentent considérablement dans les feuilles. Les chitinases A1 et A2 combinées trouvent leurs niveaux multipliés par neuf alors que ceux de B le sont par trois chez des variétés sensibles.

En plus des chitinases, la  $\beta$ -1,3-glucanase est une autre hydrolase impliquée dans les mécanismes de défense du pois en réponse aux agressions parasitaires (Lai & *al.*, 2002). Mauch et *al.* (1988b) ont démontré que la  $\beta$ -1,3-glucanase extraite des gousses de pois avait une action synergique avec les chitinases après avoir remarqué que les chitinases inhibent *in-vitro* une large gamme de pathogène y compris *A. pisi*, toutefois l'inhibition de *A. pisi* était beaucoup plus importante lorsque les chitinases et la  $\beta$ -1,3-glucanase sont combinées.

## II-2-6. Méthodes et Moyens de Lutte

La complexité des agents pathogènes sur le plan biologique et épidémique, la variabilité pathologique à l'intérieur des populations des *Ascochyta spp.* et surtout l'inexistence de variétés de légumineuses parfaitement résistantes rendent l'ascochytose l'une des maladies les plus difficile à maîtriser. Cependant il est beaucoup plus réfléchi de parler d'une gestion de la maladie que de parler de la lutte proprement dite (Gan & *al.*, 2006 ; Gurjar & *al.*, 2011).

La gestion de l'ascochytose repose sur la mise en place d'une stratégie intégrant d'une manière raisonnée, l'ensemble des moyens de lutte à savoir la lutte culturale, la lutte chimique et la lutte biologique (Pande & *al.*, 2009).

L'ensemble des stratégies de gestion de l'ascochytose des légumineuses, reposent essentiellement sur l'utilisation des variétés et de cultivars résistants, la réduction voire la destruction des inocula primaires, les rotations culturales, le choix des dates de semis, l'utilisation de semences exemptes de maladies et l'application de fongicides comme traitement de semences et traitement foliaire (Gan & *al.*, 2006 ; Davidson & Kimber, 2007).

## II-2-6-1. La lutte culturale

Les pratiques agronomiques et culturales visant la gestion de l'ascochytose reposent surtout sur la réduction au minimum des niveaux de l'inoculum et de sa survie sur les résidus de récolte et dans le sol pour échapper à l'infection initiale ou primaire (McDonald & Peck, 2009). L'ensemble des chercheurs s'accordent que les pratiques culturales qui détruisent les inocula ou réduisent au maximum leurs niveaux sont les plus importantes pour une gestion efficace de la maladie (Pande & *al.*, 2005 ; Boudreau, 2013).

L'utilisation de semences saines, la pratique des rotations avec des cultures non-hôtes telles que les céréales, la destruction des chaumes de légumineuses et des repousses spontanées et le semis profond sont autant de mesures essentielles pour réduire les quantités d'inocula et la probabilité d'apparition d'épidémies (Bailey & *al.*, 2001 ; Fernández-Aparicio & *al.*, 2010 ; Gurjar & *al.*, 2011).

Sous faible pression de la maladie, des pratiques agronomiques telles qu'un semis retardé et à faible densité peut réduire l'incidence et la gravité de la maladie (Pande & *al.*, 2005 ; Dusunceli & *al.*, 2007). Par ailleurs, les rotations culturales peuvent s'avérer efficaces dans la rupture des cycles épidémiques par des rotations d'au moins de 3 à 4 ans. De telles rotations peuvent amoindrir l'inoculum à des niveaux suffisamment bas (Shahid & *al.*, 2008). A ce titre, des niveaux d'inoculum ont pu être réduits de 90% en pratiquant des rotations de 6 ans (Khan & *al.*, 2013).

L'application d'engrais potassiques, en particulier dans les sols à forte teneur en azote, peut améliorer les rendements et retarder le déclenchement de la maladie (Kader & *al.*, 1990). Par ailleurs, le travail du sol peut être utilisé pour réduire la production d'ascospores, car l'enfouissement des restes de cultures légumineuses empêche la formation et la maturation des téléomorphes sur les résidus déjà infectés (Navas-Cortes & *al.*, 1995). Le nettoyage des champs à l'issue des récoltes réduit considérablement les inocula primaires (Marley & *al.*, 2005).

Des études ont montré que le labour et l'enfouissement des chaumes infestés peut conduire à une réduction substantielle de la gravité de l'ascochytose sur les cultures ultérieures, au début de la saison de croissance (Bailey & *al.*, 2001 ; Dugan & *al.*, 2005). A ce titre, Zhang et *al.* (2005), ont constaté que la production d'ascospores par *D. pinodes* sur des résidus de pois enfouis continuait rarement après 11 mois, quelle que soit la profondeur de l'enfouissement, mais que des quantités plus élevées étaient parallèlement produites sur des résidus à la surface du sol. Des constatations similaires concernant la

survie à la fois de *D. pinodes* et de *P. medicaginis* var. *pinodella* sur les résidus de pois sont également rapportées par Davidson et Kimber (2007).

Dans d'autres études s'intéressant à la survie de *A. rabiei* (Gossen & Miller, 2004) et de *A. lentis* (Gossen, 2001) sur des chaumes infestés, constatent qu'en dépit de l'enfouissement des résidus, les agents pathogènes ont pu survivre plus de 4 ans. Par conséquent, Gossen et Derksen (2003) et Gossen et Miller (2004) recommandent qu'en plus de l'enfouissement des résidus, des rotations culturales doivent être pratiquées et que deux voire trois cultures non-hôtes sont nécessaires entre les cultures successives de pois chiches ou des lentilles pour réduire le risque de développement d'une épidémie ascochyotique.

## II-2-6-2. La lutte chimique

Le recours aux produits phytosanitaires fongicides dans la lutte contre l'ascochytose des légumineuses repose principalement sur deux types d'application : le traitement de semences et les traitements fongicides foliaires.

### *a. Traitement de semences*

Comme il a été déjà signalé en haut, les semences infectées des légumineuses jouent un rôle primordial dans la transmission de l'ascochytose. Conséquemment, le traitement des semences est une pratique importante contre l'initiation et le développement de la maladie.

De nombreux fongicides ont été mis au point pour lutter contre les agents pathogènes séminicole et telluriques. Les premiers fongicides commercialisés comme traitement de semences étaient principalement des composés à base de cuivre et de mercure, néanmoins ceux à base de mercure ont été rapidement abandonnés et désormais sont interdits dans la plupart des pays (Ogle, 1997).

Bretag & al. (2006), rapportent que ces fongicides ont été utilisés principalement pour lutter contre les agents pathogènes du sol responsables des fontes de semis et contre certaines maladies transmises par les semences, notamment l'ascochytose. Les mêmes auteurs relatent aussi que ces fongicides étaient spécialement efficaces contre les champignons de surface et des téguments externes ainsi que les agents pathogènes entourant les semences après plantation. En revanche ces traitements se sont avérés inactifs lorsque l'infection fongique était confinée plus profondément à l'intérieur des cotylédons.

Pour remplacer les composés organo-mercurique, d'autres composés inorganiques et organiques moins toxiques et à forte et large activité fongicide ont été développés. Certains de ces fongicides tels que le Captane et le Thirame ont été largement utilisés comme traitement de semences.

Bien qu'ils ne puissent généralement pas pénétrer profondément dans la graine et ne contrôlent pas les infections profondes, ces deux produits ont montré une grande efficacité lorsque l'infection des graines de pois se limite aux enveloppes externes de la graine (Ali & *al.*, 1982 ; Xue, 2000). Maude et *al.* (1986b), ont démontré que ces produits étaient davantage efficaces et avec une meilleure pénétration lorsqu'ils sont appliqués sous forme de bouillies, on y trempant les semences, plutôt que sous forme de poudres sèches.

Des essais réalisés par Demirci et *al.* (2003), ont montré un taux de réduction des niveaux d'inoculum des semences de pois chiche avoisinant les 90% suite à un traitement au Carbendazime ou au Chlorothalonil. Wise et *al.* (2011) constatent également une sensibilité *in-vitro* et sur champ de *D. rabiei* au Prothioconazole et au Thiabendazole. Des essais consacrés à l'effet de cinq fongicides, à savoir le Chlorothalonil, l'Azoxystrobine, la Pyraclostrobine, le Mancozèbe et le Boscalide, sur l'ascochytose du pois chiche ont montré des résultats très concluants où la gravité de la maladie était réduite à 25% après avoir frôlé les 99% dans des lots de semences non traités (Banniza & *al.*, 2011).

D'autres études consacrées au groupe des Benzimidazoles, en particulier le Bénomyl et le Thiabendazole, ont révélé qu'une application en mélange de ces deux fongicides donne des résultats intéressants comme traitement de semences de pois chiche, en revanche, ils se sont montrés moins efficaces lorsqu'ils sont appliqués séparément (Kaiser & Hannan, 1988). Par ailleurs, ces deux fongicides semblent être les plus efficaces pour anéantir l'ascochytose transmises par les semences et sont par conséquent largement utilisés (Maude & *al.*, 1986a).

### ***b. Fongicides foliaires***

L'ensemble des chercheurs s'accordent que l'ascochytose des légumineuses peut être contrôlée efficacement par des pulvérisations foliaires de fongicides. Les premiers essais sur champ citent des fongicides inorganiques à large spectre tels que la bouillie bordelaise et l'oxychlorure de cuivre comme produits efficaces contre la maladie, néanmoins leur efficacité reste très limitée dans le temps, d'où la nécessité d'applications répétitives (Bretag & *al.*, 2006).

Plus tard, des fongicides organiques à large spectre ont été testés et ont donné des résultats intéressants dans la lutte contre l'ascochytose du pois, c'est le cas surtout du Thirame, du Chlorothalonil (Warkentin & *al.*, 2000), du Mancozeb et du Top<sup>®</sup> dont la formulation associe l'Azoxystrobine et le Difenconazole (Amin & Melkamu, 2014). Bien que la période de protection ne soit pas la même pour tous ces produits, leur activité est relativement longue comparativement aux produits organiques et présentent à la fois des propriétés préventives et curatives lorsqu'ils sont appliqués sur le feuillage des cultures.

Courant les trois dernières décennies, Les dithiocarbamates ont pris une grande place dans la lutte contre l'ascochytose des légumineuses. Cependant, un grand nombre de produits de ce groupe étaient particulièrement efficaces. Toutefois, les produits de ce groupe présentaient deux inconvénients majeurs. D'une part leur activité protectrice se limitait au site d'application ou de contact, d'où la nécessité de l'uniformité de pulvérisation sur tout le feuillage, d'autre part, ces produits ne protégeaient les cultures que pour une période relativement courte et des applications répétées étaient alors nécessaires pour lutter contre la maladie durant toute la saison de culture (Bretag & *al.*, 2006 ; Armstrong-Cho & *al.*, 2008).

Dans des essais *in-vitro* consacrés à la sensibilité de 324 isolats de *D. pinodes* à la Pyraclostrobine, fongicide de la famille des Strobilurines, Bowness et *al.* (2016), ont constaté que des doses allant de 0,03 à 0,29 mg litre<sup>-1</sup> étaient suffisantes pour réduire la croissance mycélienne de 50%, alors qu'il suffisait que 0.008 à 0.041mg litre<sup>-1</sup> pour inhiber de moitié la germination des conidies.

Des fongicides systémiques ont été également utilisés pour lutter contre l'ascochytose, c'est le cas surtout des fongicides du groupe des Benzimidazoles tels le Bénomyl, le Carbendazime et le Thiabendazole. En plus de leur action préventive et curative, ces produit ont l'avantage d'avoir une activité plus ou moins longue, ce qui réduit le nombre de rappel de traitement (Bretag, 1985 ; Warkentin & *al.*, 1996). Outre l'efficacité des fongicides du groupe des Benzimidazoles comme traitement de semences, Liu et *al.* (2016), signalent également leur efficacité comme traitement foliaire dans une étude incluant cinq fongicides de ce groupe à savoir le Tridemorph, le Difenconazole, le Prochloraz, le Tebuconazole et le Propiconazole.

Par ailleurs, Davidson et Kimber (2007), rapportent que les pulvérisations foliaires du Chlorothalonil sont généralement efficaces lorsqu'elles sont appliquées tôt au début de la floraison ou au début de la formation des gousses chez des cultivars de féverole, de lentilles et de pois chiches partiellement résistants. A cet effet, le

Chlorothalonil reste le fongicide le plus utilisé dans la lutte chimique contre l'ascochytose des différentes cultures légumineuses étant donné qu'il joue le rôle le plus efficace dans la réduction des épidémies (Chongo & *al.*, 2003 ; Gan & *al.*, 2006 ; McMurray & *al.*, 2006 ; Shtienberg & *al.*, 2006 ; McMurray & *al.*, 2011 ; Gossen & *al.*, 2014).

### II-2-6-3. Résistance et sélection variétale

La résistance des plantes aux maladies a été toujours considéré comme l'un des principaux objectifs de la plupart des programmes de sélection variétale (Tivoli & *al.*, 2006). L'utilisation de la résistance de l'hôte est le moyen le plus économique dans la lutte et la gestion des maladies. La résistance à l'ascochytose est une priorité majeure dans les programmes de sélection de légumineuses à travers le monde. Aucun des cultivars ou des variétés de ces programmes ne présente une résistance ou une immunité totale à l'ascochytose en raison de la complexité de la relation hôte-pathogène, mais un certain nombre de cultivars des différentes espèces légumineuses présentent une résistance partielle (Davidson & Kimber, 2007 ; Kanouni & *al.*, 2011).

La résistance à l'ascochytose est présente dans le germoplasme de toutes les légumineuses alimentaires. Dans la plupart des cas, la résistance complète est inexistante et elle n'est que partielle. Néanmoins, il a été démontré que la résistance disponible, partielle qu'elle soit, pouvait réduire l'impact de l'ascochytose et les pertes de rendement et de la qualité des graines (Davidson & Kimber, 2007 ; Muehlbauer & Chen, 2007 ; Khan & *al.*, 2013).

La résistance des légumineuses à l'ascochytose a été recherchée suivant des programmes d'exploration de germoplasmes, de collecte et d'évaluation systématique du matériel génétique (Muehlbauer & Chen, 2007 ; Siddique & *al.*, 2013 ; Singh & *al.*, 2014). Des sources de résistance partielle ont été identifiées chez toutes les légumineuses alimentaires et la résistance actuellement disponible est utilisée dans les programmes d'amélioration et de sélection conçus pour développer des cultivars présentant la moindre résistance à la maladie (Ye *et al.*, 2002 ; Pande & *al.*, 2005 ; Bretag & *al.*, 2006 ; Torres & *al.*, 2006).

Actuellement, la recherche s'oriente surtout vers l'exploitation des ressources génétiques liées à la résistance aux maladies chez les espèces de légumineuses sauvages. Dans ce sens, une résistance à *D. rabiei*, agent de l'ascochytose du pois chiche a été décelée chez plusieurs espèces sauvages du genre *Cicer*, telles que *C. judaicum* Boiss., *C. pinnatifidum*

Jaub. & Sp. (Collard & *al.*, 2001), *C. echinospermum* P.H. Davis, *C. reticulatum* Ladiz et *C. bijugum* K.H. Rech. (Collard & *al.*, 2003). Singh et *al.* (1999), ont constaté que *C. reticulatum* et *C. echinospermum* présentaient une compatibilité de croisement avec *C. arietinum*. Par conséquent, les sources de résistance présentes chez ces deux espèces sauvage peuvent être introduites dans des cultivars de pois chiches. Pour les espèces non compatibles des techniques de culture *in-vitro* et des techniques transgéniques pourraient constituer une solution pour franchir les croisements entre partenaires présentant des incompatibilités génétiques (Singh & Ocampo, 1997).

Quant au pois, aucune résistance complète au complexe ascochyta n'a été identifiée, en revanche des sources de résistance partielle ont été identifiées et sont en voie d'exploitation dans des programmes de sélection (Tivoli & *al.*, 2006). C'est le cas surtout du cultivar Carnaval (Tar'an & *al.*, 2003). D'autres programmes de screening de matériel génétique de pois ont permis d'identifier des sources de résistance partielle à *D. pinodes* chez cinq lignées à savoir PI 142441, PI 142442, PI 381132, PI 404221 et PI 413691, néanmoins toutes ces lignées n'était plus résistante que le cultivar Radley, pris comme référence en matière de résistance. Un pois sauvage, à savoir *Pisum fulvum* est également cité comme une espèce chez laquelle des niveaux de résistance à l'ascochytose ont été observée (Muehlbauer & Chen, 2007).

Bretag et *al.* (2006), rapportent que d'excellentes sources de résistance à *A. pisi* existent chez quelques variétés de pois et ont été utilisées avec succès dans le développement de nouvelles variétés résistantes à ce champignon alors que, seuls des niveaux modérés de résistance à *D. pinodes* ou à *P. medicaginis var. pinodella* ont été observés. Par ailleurs, Gurung et *al.* (2002), signalent que les meilleures sources de résistance à ces champignons ont été décelées chez les espèces primitives du genre *Pisum* et *Lathyrus*, mais les tentatives de transfert de cette résistance au pois cultivé ont été infructueuses. Pareillement, une importante résistance a été décelé chez *Medicago truncatula* Sardi à l'égard de *P. medicaginis var. pinodella* (Ellwood & *al.*, 2006) et *D. pinodes* (Moussart & *al.*, 2007).

#### II-2-6-4. La lutte biologique

La lutte biologique consiste surtout en l'utilisation de microorganismes pour tenter de maîtriser et à contrer des agents phytopathogènes. Il s'agit d'un alternatif accessible et peut couteux comparativement aux moyens de lutte conventionnels (Cook & Baker, 1983 ; Baker & Paulitz, 1996).

S'agissant de l'ascochytose des légumineuses, il y a lieu de citer quelques études qui ont testé l'effet de quelques agents biologiques à l'égard du genre *Ascochyta*. Küçük et

*al.* (2007), Signalent des taux d'inhibition *in-vitro* de la croissance de *A. rabiei*, agent de l'ascochytose du pois chiche en le confrontant à *Trichoderma harzianum* ; champignon tellurique connu pour son activité antifongique en sécrétant dans le milieu des chitinasés qui empêche la formation de la paroi de la cellule fongique.

Wang et *al.* (2003), dans une étude consacrée à l'ascochytose du pois, ont observé une nette réduction de la gravité de la maladie causée artificiellement par *A. pisi* suite à des traitements avec des antagonistes bactériens appartenant aux genres *Serratia* et *Bacillus* et des souches de *Pseudomonas fluorescens*. De même, trois souches de *Bacillus sp.* et une souche de *Pantoea agglomerans* ont présenté, sous conditions contrôlées et en plein champ, des effets significatifs dans la réduction de la sévérité de l'ascochytose du pois induite artificiellement par *D. pinodes* (Liu & *al.*, 2016).

Bretag et *al.* (2006), relatent que le pois peut être protégé des attaques de *D. pinodes* par un traitement bactérien à base de *Pseudomonas phaseolicola* ou encore par inoculation préalable par *A. fabae* ou par des souches avirulentes de *A. pisi* ou de *D. pinodes*. Les mêmes auteurs rapportent que ces traitements conduisent à une réduction du nombre de taches nécrotiques ainsi que leur taille, en effet ils supposent que de telles observations seraient liées à l'accumulation de la pisatine, substance connue pour son rôle dans le système de défense du pois contre les agressions parasitaires.

#### **II-2-6-5. Gestion intégrée de la maladie**

La gestion de l'ascochytose est une composante essentielle de la réussite de la production des légumineuses (Davidson & Kimber, 2007). L'adoption d'une stratégie de lutte efficace peut s'avérer difficile en raison de la complexité des pathosystèmes *Ascochyta*/légumineuses, de l'épidémiologie de l'ascochytose, de la biologie et de la variabilité pathologique des agents causaux et l'absence de variétés ou de cultivars totalement résistants (Bretag & *al.*, 2006 ; Shahid & *al.*, 2008).

Le recours à un seul moyen de lutte reste cependant inefficace. A cet égard, une maîtrise efficiente des épidémies doit combiner d'une manière raisonnée la résistance des cultivars, les semences indemnes de maladie, les traitements fongicides et les pratiques culturales qui incluent la destruction et enfouissement des chaumes et de repousses spontanées, les dates de semis appropriées et les rotations culturales (Vail, 2005 ; McDonald & Peck, 2009 ; Stoddard & *al.*, 2010 ; Ahmed *al.*, 2016 ; Tran 2017).

L'inexistence de variétés ou de cultivars de légumineuses alimentaires totalement résistants et le poids économique des autres moyens de lutte, ont fait que le recours aux traitements chimiques reste le moyen le plus efficace pour contrer les

épidémies de l'ascochytose. En revanche, l'utilisation répétée et abusive des fongicides de synthèse, particulièrement sous une forte pression de la maladie, ne va pas sans inconvénients. En dépit du coût élevé et les risques de développement des résistances chez les agents pathogènes vis-à-vis de telle ou telle molécule, les méfaits des traitements fongicides à l'égard de l'environnement et de la santé humaine et animale ne sont plus à démontrer. A ce terme, la recherche de moyens alternatifs à la fois efficaces contre les maladies des plantes et protecteurs de l'environnement et de la santé est plus que nécessaire.

## *Deuxième partie* : **Matériel et méthodes**

*Chapitre I* : **Matériel biologiques**

*Chapitre II* : **Techniques phytochimiques**

*Chapitre III* : **Activité antifongique *in-vitro* des extraits végétaux**

*Chapitre IV* : **Activité antifongique *in-vivo* des extraits végétaux**

*Chapitre V* : **Traitement statistique des résultats**

## Chapitre I : Matériel biologiques

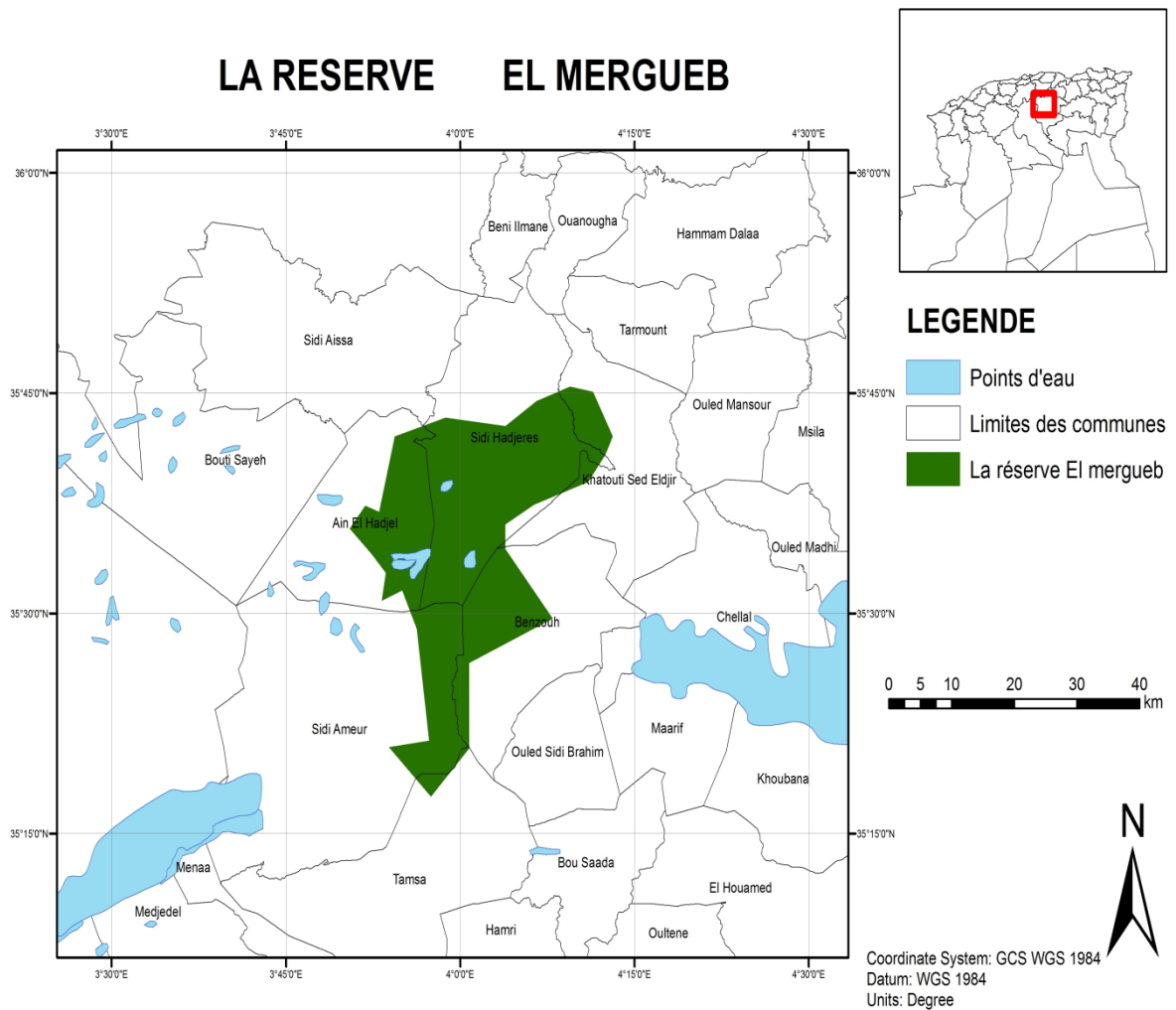
### I-1. Plantes source d'extraits

Le matériel végétal constituant la source des extraits végétaux est un ensemble de huit espèces de plantes, appartenant à des familles différentes et poussant spontanément dans les steppes algériennes, elles ont été collectées dans la réserve naturelle d'El-Mergueb, située au centre de l'Algérie, dans la steppe du Hodna précisément (Figure 32). Ces plantes, considérées comme des espèces typiques et très répandues dans la steppe algériennes, sont : *Artemisia alba* Turra., *Artemisia campestris* L., *Cleome arabica* L., *Lycium arabicum* Schweinf. ex-Boiss., *Peganum harmala* Linn., *Thapsia gorganica* L., *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl., *Thymelaea microphylla* Coss & Dur. (Figure 33).

La sélection de ces espèces végétales s'est effectuée sur la base de leur importance dans la pharmacopée et la médecine traditionnelles, importance appréciée suite à des entretiens directs avec des riverains de la région, des phytothérapeutes et guérisseurs traditionnels et des herboristes. De plus, le choix de ces plantes s'est également basé sur leur abondance dans la zone de collecte, abondance que nous l'avions estimé visuellement.

**I-1.1. *Artemisia alba* Turra :** Plante steppique appartenant à la famille des composées (*Asteraceae*), c'est une espèce vivace de 40 à 80 cm, elle possède des capitules solitaires à l'extrémité des rameaux axillaires, grêles et longs de 3 à 4 cm. Très abondante en zones steppiques, plus rare au Sahara septentrional (Ozenda, 2004). En Algérie la plante est connue sous le nom de “ *Achib* = الشبج ”. *A. alba* est utilisé comme aromatisant pour le café et le thé, mais aussi comme plante médicinale pour le traitement du rhume, de la toux, des troubles intestinaux et comme agent antidiabétique. Des recherches sur les propriétés médicinales d'extraits de *A. alba* ont révélé également des propriétés leishmanicides, antibactériennes, antifongiques et antioxydantes (Akrouit & al., 2010).

**I-1.2. *Artemisia campestris* L. :** plante de la famille des composées (*Asteraceae*) de 30 à 150 cm, à rameaux constituant une panicule plus ou moins ample. Tige ligneuse à la base et striée, feuilles glabrescentes, vert foncé, elle pousse le plus dans les Hauts-Plateaux méditerranéens, absente au Sahara septentrional, plus rare au Tassili (Ozenda, 2004). Localement, *A. campestris* est connu sous le nom de “ *T'gouft* = تفوفت ”. Les feuilles de cette plante sont largement utilisées en médecine traditionnelle sous forme de décoction pour leurs propriétés anti-venin, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et antirhumatismales (Boutemak & al., 2015).



**Figure 32 :** Situation géographique de la réserve naturelle El Mergueb. Adaptée de Sekour et *al.* (2015)

**I-1.3. *Cleome arabica* L. :** Cette espèce est classée dans la famille des capparidacées ou capparacées (*Capparaceae*), en Algérie elle est dite “ *Nettine* = نتين ”. Il s’agit d’une plante vivace de 30 cm de hauteur en moyenne, ses tiges sont dressées et ramifiées et ses feuilles sont petites, poilues et trifoliées dont les folioles sont lancéolées. C’est une plante à odeur fétide, toxique et provoque des effets hallucinogènes. Ces glandes stipées sécrètent une substance visqueuse (Ozanda, 2004). La plante est surtout citée pour ses effets répulsifs et anti-appétissants à l’égard des insectes, dans ce sens, Kemassi et *al.* (2012), rapportent que cette plante est toujours épargnée par le criquet pèlerin.

**I-1.4. *Lycium arabicum* Schweinf. ex-Boiss. :** Connue sous le nom de “ *Awsaj* = العوسج ”. C’est un arbuste épineux glabre, à feuilles petites, oblongues, spatulées et fasciculées. Calice urcéolé non accrescent. Arbuste assez élevé à épines fortes, nues ou portant 1 à 2 fascicules feuillées. Feuilles non charnues, lancéolées linéaires. Ozenda (2004), inclue cette espèce dans la famille des Solanacées (*Solanaceae*). Dans la

médecine traditionnelle en Afrique du Nord, le jus ou la décoction de feuilles de *L. arabicum* sont utilisés comme collyre pour le traitement des maladies ophtalmiques. Les fruits de cette espèce possèdent des propriétés plus ou moins similaires à celles des feuilles (Cherouana & al., 2013).

**I-1.5. *Peganum harmala* Linn.** : C'est une plante herbacée vivace, glabre et qui peut atteindre 30–100 cm de hauteur. Ozenda (2004), classe cette espèce dans la famille des zygophyllacées (*Zygophyllaceae*). Son habitat normal est constitué de terrains et de parcours semi-arides steppiques et des sols sableux. Elle est connue en Afrique du Nord sous le nom de “ *Harmel* = الحرمل ”. La plante a des feuilles alternées ressemblant à des lanières, qui ont une forte odeur dissuasive lorsqu'elles sont froissées. Les fleurs sont blanches solitaires à veines vertes (Mahmoudian & al., 2002).

Les graines de *P. harmala* sont utilisées en médecine traditionnelle comme anti-hémorroïde et stimulant du système nerveux central. Au Moyen-Orient et en Afrique du Nord, cette plante est utilisée en médecine traditionnelle comme anthelminthique, lactogogue, antispasmodique, antipyrétique, abortif et antimicrobien (Najjaa & al., 2017).

**I-1.6. *Thapsia garganica* L.** : Plante vivace de 90 à 140 cm de hauteur, sa tige est striée, glabre et ramifiée dans sa partie supérieure. Les feuilles sont vertes et glabres. Elles sont petites et elliptiques. La racine est volumineuse, noirâtre extérieurement et blanche intérieurement. L'inflorescence est une grande ombelle composée à 15-20 rayons, portant des fleurs jaunes. Le fruit est elliptique, comprimé dorsalement, de 10-15 sur 20-25 mm. Ozenda (2004), inclue cette espèce dans la famille des apiacées (*Apiaceae*).

*T. garganica*, dite localement “ *Bounafaa* ou *Derias* = بونافع او الدرياس ”, est une plante médicinale traditionnellement utilisée comme diurétique, émétique et laxatif. La plante est également utilisée en Afrique du Nord contre les envenimations scorpioniques (Bouimeja & al., 2018).

**I-1.7. *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl.** : C'est une plante de la famille des Thymelaeacées (*Thymelaeaceae*), vivace, arbustive et qui peut atteindre les 2 à 3 m de hauteur. Ses feuilles sont très petites, densément imbriquées, coriaces et ovoïdes (Ozenda, 2004). Elle est très fréquente dans les régions sèches et ensoleillées, plus spécialement dans les formations steppiques (Denelle & Puech, 1985). *T. hirsuta*, nommée localement “ *Almethnan* = المثنان ”, est une plante très utilisée en médecine traditionnelle pour ces propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes (Miyamae & al., 2009 ; Akrouit & al., 2011).



*Artemisia alba*



*Artemisia campestris*



*Cleome arabica*



*Lycium arabicum*



*Peganum harmala*



*Thapsia garganica*



*Thymelaea hirsuta*



*Thymelaea microphylla*

Figure 33 : Plantes sources d'extraits. Originale (2013).

**I-1.8. *Thymelaea microphylla* Coss. & Dur.** : Arbrisseau de 30 cm à 1 mètre, à rameaux nombreux, dressés, allongés et blanchâtre-soyeux, feuilles lancéolées, très petites (quelque mm) et espacées, fleurs blanc- jaunâtre en glomérules, très commun dans les steppes des hauts plateaux algériens, plus rare au Sahara (Ozenda, 2004). *T. microphylla*, appelée localement “ *Al Methnan labyad* = المثنان الأبيض ”, est utilisée en médecine traditionnelle comme antibactérien pour le traitement des plaies, de l'érysipèle, des boutons et des abcès (Ghanem & al., 2014). Noman & al. (2011), citent plusieurs études qui attribuent à cette plante des activités antibactériennes, antioxydantes et anti-inflammatoires remarquables.

## I-2. Pois et pois chiche

Parmi les légumineuses cultivées en Algérie, le pois et le pois chiche sont considérés comme les plus importants. Ils sont très consommés par l'algérien et ils occupent une place prépondérante dans le calendrier agricole de beaucoup de régions algériennes. A cet effet, ils ont été retenus comme plantes hôtes dans nos essais consacrés au pathosystème *Fabaceae/Ascochyta*.

En ce qui concerne le pois (*Pisum sativum* L.), nous avons opté pour la variété “ *Solara* ”. La semence a été procurée auprès de ACI Algérie (*Agro Consulting International, Sarl*), Oued Romane, Alger (Algérie). C'est une variété très sensible aux trois agents phytopathogènes du complexe *ascochyta* et souvent utilisée dans les études s'intéressant au pathosystème pois/*Ascochyta* (Roger & Tivoli, 1996 ; Garry & al., 1998 ; Béasse & al., 2000).

S'agissant du pois chiche (*Cicer arietinum* L.), notre choix s'est porté sur la lignée “ *ILC1929* ”. C'est une lignée connue pour être sensible à tous les pathotype de *A. rabiei* et beaucoup de chercheurs la considère comme une référence en matière de sensibilité à l'ascochytose (Vogelsang & Barz, 1990 ; Jamil & al., 2000 ; Imtiaz, 2011). Cette lignée, que nous avons obtenue de l'ITGC de Constantine (Algérie), est d'origine ICARDA (*International Center for Agricultural Research in the Dry Areas*).

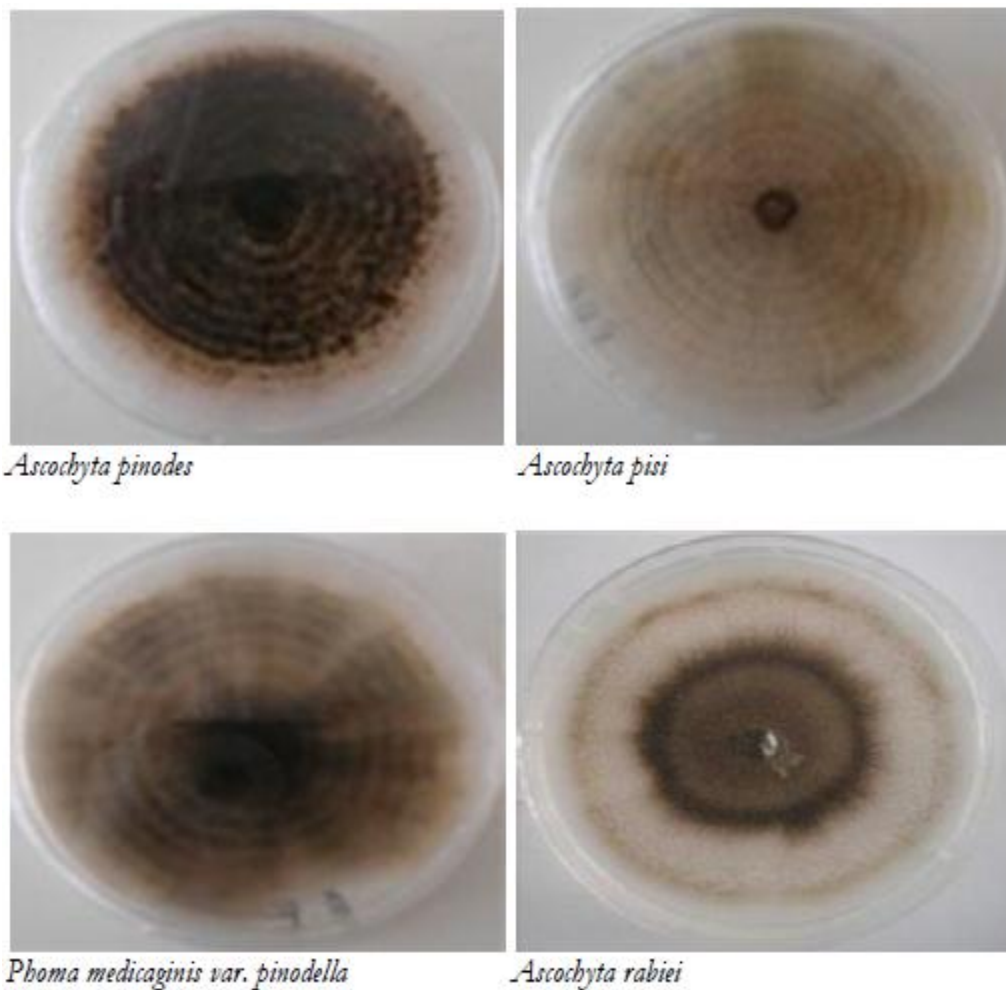
## I-3. Matériel fongiques

Le matériel fongique est constitué de quatre champignons causant l'ascochytose du pois et du pois chiche (Figure 34).

Ceux inféodés au pois sont les trois espèces du complexe *ascochyta*, *i.e.* *Ascochyta pinodes* L. K. Jones [téléomorphe *Didymella pinodes* (Berk. & A. Bloxam) Petrak.], *Ascochyta pisi* Libert [téléomorphe *Didymella pisi* MI. Chilvers & al.] et *Phoma medicaginis*

Malbranche & Roumeguère *var. pinodella* (L.K. Jones) Boerema [téléomorphe *Didymella pinodella* (L.K. Jones) Q. Chen & L. Cai]. Toutes ces espèces, considérées comme souche de référence, ont été acquises de la mycothèque de Julius Kühn-Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Allemagne.

Le quatrième champignon est *Ascochyta rabiei* (Passerini) Labrousse [téléomorphe *Didymella rabiei* (Kovatschevski) Arx], agent causal de l'ascochytose du pois chiche. Il s'agit également d'une souche de référence appartenant au pathotype II, très virulente (Peever & *al.*, 2012). Cette souche, répertoriée sous le nom de AR628, nous a été octroyée par le USDA-ARS laboratory, Pullman, WA, USA.



**Figure 34 :** Espèces fongiques, cultures sur *Potato Dextrose Agar*, âgées de 15 jours. Originale (2014).

#### I-4. Milieux de culture

Le choix d'un milieu de culture repose sur son adéquation pour un bon développement du champignon. Etant donné qu'il s'agit de champignons hétérotrophes, trois milieux de culture organiques de base ont été utilisés le long des travaux expérimentaux. Il s'est agi du milieu V8 (*Vegetable Soup*) consacré aux essais portant sur

les trois espèces du complexe ascochyta, du milieu CSMDA (*Chickpea Seed Meal Dextrose Agar*) destiné aux tests sur *A. rabiei* et du milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*) utilisé dans les tests de germination des conidies appartenant aux quatre espèces. La composition de chacun des milieux est rapportée dans les tableaux 05, 06 et 07.

**Tableau 05 :** Composition de base du milieu V8 (*Vegetable Soup = Vegetable Juice Agar*). Messiaen & al. (1991) et Champion (1997).

| Ingrédient  | Quantité |
|---|----------|
| Soupe de légumes V8 ( <i>Campbell</i> <sup>MD</sup> ) | 170g     |
| Agar agar   | 15g      |
| Eau q.s.p.  | 1000ml   |

**Tableau 06 :** Composition de base du milieu CSMDA (*Chickpea Seed Meal Dextrose Agar*). Rapilly (1968).

| Ingrédient                    | Quantité |
|-------------------------------|----------|
| Farine de pois chiche (grain) | 70g      |
| Agar agar                     | 15g      |
| Glucose                       | 20g      |
| Eau q.s.p.                    | 1000ml   |

**Tableau 07 :** Composition de base du milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*). Rapilly (1968).

| Ingrédient  | Quantité |
|---|----------|
| Pomme de terre (épluchée et coupée en petits dés) | 200g     |
| Agar agar   | 15g      |
| Glucose   | 20g      |
| Eau q.s.p.  | 1000ml   |

Afin de faire ressortir d'éventuel effet antifongique d'une substance additionnée à un milieu de culture d'un champignon, un appauvrissement de milieu et un tamponnement du pH le long des tests sont souvent suggérés. Cependant, les quantités d'ingrédients dans les trois milieux utilisés sont réduites de moitié pour le même volume (1litre), à l'exception de la quantité d'agar agar qui est maintenue telle qu'elle est sus-indiqués (Molot, 1979).

Par ailleurs, un tampon est ajouté aux milieux en ajustant leur pH à 5,6, pH optimal pour le développement des *Ascochyta spp.* selon Hwang (2004). Le tampon de pH se compose de phosphate monopotassique et de phosphate disodique (Tableau 08).

**Tableau 08 :** Composition du tampon de pH.

| <b>Composé</b>   | <b>Quantité</b> |
|--|-----------------|
| PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K à 9,07 g L <sup>-1</sup> d'eau distillée  | 917,5 ml        |
| PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> à 11,87 g L <sup>-1</sup> d'eau distillée | 82,5ml          |

## Chapitre II : Techniques phytochimiques

### II-1. Obtention des extraits

#### II-1-1. Préparation des plantes

Tous les extraits végétaux ont été obtenus des parties aériennes des plantes. Une fois collecté, le matériel végétal est nettoyé et mis à sécher sous les conditions ambiantes du laboratoire (18 à 23° C, 45% d'humidité relative moyenne) et à l'obscurité pour éviter la photo-oxydation (Seidel, 2006 ; Mahlot & *al.*, 2010). Une fois sec, le matériel végétal est alors broyé et réduit en une poudre très fine dans un broyeur de végétaux à couteaux (*Retsch*<sup>®</sup> *Grindomix GM200*). La poudre obtenue est ensuite stockée à l'obscurité dans des sacs en papier jusqu'à utilisation.

#### II-1-2. Extraction

L'extraction est réalisée dans un montage intégrant un tube Soxhlet (Figure 35). C'est un procédé d'extraction solide-liquide en mode continu. Il permet de répéter le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet des solutés contenus dans la matière solide. Cette dernière (matériel végétal) est placée dans une cartouche en cellulose perméable au solvant.

Le solvant, contenu dans le ballon, est évaporé à la plus faible température possible pour éviter la thermodestruction, la vapeur est alors amenée dans le réfrigérant, situé dans la partie supérieure du montage, pour qu'elle soit condensé. Lorsqu'il est liquéfié, le solvant retourne et s'accumule dans le tube extracteur (tube Soxhlet), où il entre en contact avec le solide (poudre végétale) contenu dans la cartouche. Par effet siphon, le solvant chargé de matière extractible est renvoyé dans le ballon, où il est à nouveau évaporé et le cycle se répète. Plusieurs cycles d'extraction sont à effectuer, au point où on considère avoir atteint l'épuisement total des solutés contenus dans le solide (Leybros & Frémeaux, 1990).

Au terme de l'extraction, l'extrait est séparé du solvant par évaporation de ce dernier, opération réalisée sous vide dans un évaporateur rotatif. Une fois le solvant est complètement évaporé, le résidu de l'évaporation ou l'extrait reste dans le ballon alors que le solvant passe dans un autre ballon collecteur. Dans le cas de nos essais, 30g de poudre de chacune des plantes, sont passé séparément dans le montage d'extraction (Figure 36), tenant compte de sa polarité, le solvant utilisé est l'éthanol (Scherf & *al.*, 2010 ; Do & *al.*, 2014 ; Abarca-Vargas & *al.*, 2016) à 96% de pureté. Une fois l'extraction arrive à sa fin, la

solution récupérée est passée dans un évaporateur rotatif (*Rotavapor R-210 BUCHI*), couplé à un cryostat et une pompe à vide (évaporation sous vide), afin d'évaporer l'éthanol (Figure 37).



**B** : Ballon chauffé contenant le solvant

**E** : Tube Soxhlet contenant la cartouche remplie de matière solide

**R** : Réfrigérant dans lequel un flux d'eau froide circule

**Figure 35** : Représentation du montage d'extraction Soxhlet. Leybros & Frémeaux (1990).

À l'issue de l'évaporation, les résidus secs sont pesés et dissouts ensuite dans de l'éthanol (96%) de telle sorte à obtenir des solutions stock à 50% (p/v). Ces solutions, conservées dans des flacons opaques à  $-10^{\circ}\text{C}$ , serviront ensuite à la préparation de solutions filles à utiliser dans les différents bioessais. Au moment de l'utilisation, la fraction éthanolique de chacune des solutions stock est évaporée, l'extrait sec obtenu est alors dissout dans une solution aqueuse à 3% d'éthanol.



**Figure 36** : Système d'extraction Soxhlet. Originale (2014)



Figure 37 : Evaporation rotative du solvant. Originale (2014)

## II-2. Rendement en extraits

Le rendement en extrait est un paramètre qui nous renseigne sur la richesse d'un matériel végétale en matière extractible et l'efficacité de la technique d'extraction et du solvant à extraire un maximum de composants phytochimiques (Murugan & Parimelazhagan, 2014). Conformément à Walsh (2003), le rendement en extrait est mesuré pour les huit plantes sources d'extraits, suivant la formule ci-après.

$$Y_{ex} (\%) = \frac{M_{ex}}{M_{pv}} \times 100$$

$Y_{ex}$  : Rendement en extrait ;  $M_{ex}$  : Masse de l'extrait ;  $M_{pv}$  : Masse de la poudre végétale mise en extraction.

## II-3. Fractionnement des extraits végétaux bruts

Le fractionnement d'un extrait végétal brut consiste à subdiviser et à séparer les différents composants qui le constituent. Il s'agit de dissoudre et de laver l'extrait végétal successivement par un ensemble de solvants, les constituants se séparent ainsi par partition entre les liquides suivant leur solubilité (Sarker & *al.*, 2006).

Dans nos essais, le fractionnement des extraits végétaux bruts à été effectué suivant un procédé dit *shake-out* (Figure 38). Ce procédé repose sur le principe de la solubilité des différents constituants des extraits dans des solvants à différentes polarité.

La séparation des différents constituants s'effectue alors par un partage liquide/liquide (Jones & Kinghorn, 2006).

L'opération de fractionnement a concerné trois extraits, jugés intéressants à l'état brut. Il s'agit des extraits issus de *A. alba*, de *L. arabicum* et de *P. barmala*. Du point de vue opératoire et selon Scherf (2011) et Scherf et al. (2012), la phase éthanolique de chacune des trois solutions stock est évaporée sous vide dans un évaporateur rotatif.

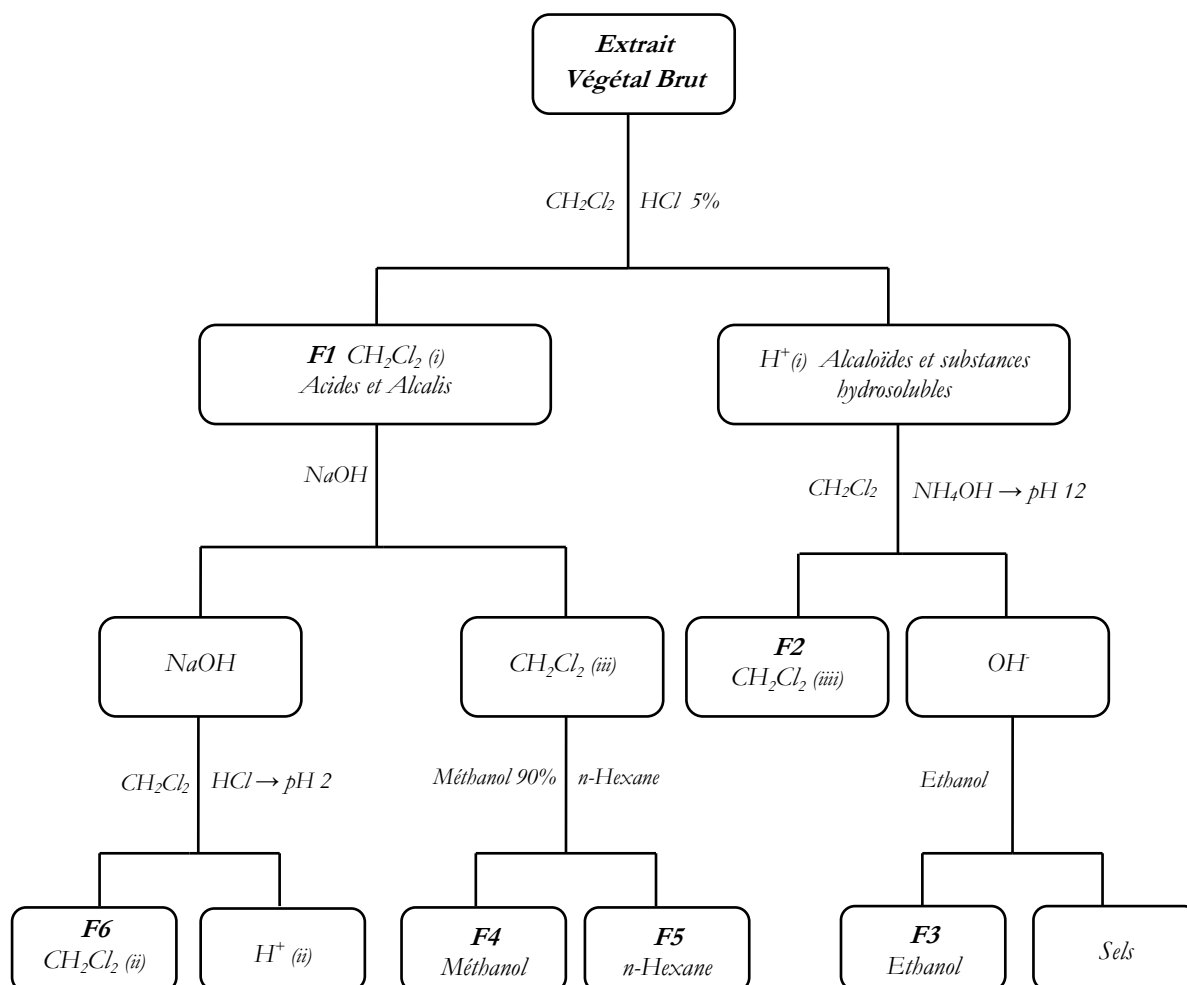
Dans une ampoule à décanter, l'extrait sec est ensuite dilué avec deux volumes égaux de dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) et d'acide chlorhydrique (HCl) à 5%. Successivement, cette opération est répétée autant de fois (trois fois minimum) sur la phase surnageante (phase dichlorométhanique) par lavage, après l'avoir séparé de l'autre phase, avec un volume égale de l'autre solvant jusqu'à ce que l'une des deux phases soit la plus claire possible. Au terme de ce lavage, l'ensemble des phases solubles dans le dichlorométhane sont mélangés, ce mélange est libellé **F1**.

S'agissant de la phase aqueuse (phase HCl), elle est alcalinisée avec de l'ammoniaque ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) à 33% jusqu'au pH 12 et lavée ensuite plusieurs fois au dichlorométhane, les phases dichlorométhaniques issues de ce lavage sont à leur tour mélangées et libellées **F2** (alcaloïdes). La nouvelle phase aqueuse est évaporée et le résidu sec est lavé de nouveau à l'éthanol 96%. Le surnageant est nommé **F3** (alcaloïdes quaternaires et sucres) alors que les sels précipités sont écartés.

La phase dichlorométhanique (F1) de la première étape de fractionnement est lavée plusieurs fois avec une portion de soude caustique (NaOH) à 5% équivalente à son volume. À l'issue de ce lavage, la phase  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  est passée dans un évaporateur rotatif afin d'évaporer le dichlorométhane. Le résidu d'évaporation est ensuite dissout dans deux volumes égaux de méthanol à 90% et de *n*-hexane. La phase méthanolique est nommée **F4** (terpènes et stérols) alors que la phase hexanique est libellée **F5** (lipides et cires).

La phase aqueuse de l'étape précédente (phase de la solution de la soude) est acidifiée avec de l'HCl à pH 2 puis lavée plusieurs fois avec un volume équivalent de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  frais. La nouvelle phase dichlorométhanique est nommée **F6** (substances acides incluant phénols, flavonoïdes) alors que la phase aqueuse est écartée.

En fin de fractionnement, les solvants de toutes les fractions sont évaporés sous vide dans un évaporateur rotatif. Quant aux résidus secs (sous-fractions) ils sont dissouts séparément dans de l'éthanol à 96% de telle sorte à obtenir des solutions stock à 50% (p/v), les solutions des sous-fractions sont également conservées dans des flacons opaques à  $-10^\circ\text{C}$  jusqu'à utilisation.



**Figure 38** : Diagramme de fractionnement des extraits végétaux bruts. Adaptés de Scherf (2011).

**F1** : substances acides et alcalis, **F2** : alcaloïdes, **F3** : alcaloïdes quaternaires et sucres, **F4** : terpènes et stérols, **F5** : lipides et cires, **F6** : substances acides, phénols et flavonoïdes.

## II-4. Tests phytochimiques

Un ensemble de tests phytochimiques est réalisé dans le but de vérifier et de confirmer la présence de certains phytoconstitués connus pour être bioactifs. Ces tests ont concerné les extraits bruts issus de *A. alba*, de *L. arabicum* et de *P. harmala* ainsi que leurs sous-fractions respectives F2, F3, F4 et F6.

Ils ont visé les alcaloïdes dans la F2 et la F3, les terpènes et stérols dans la F4 et les flavonoïdes et autres composés phénoliques dans la F6. Par ces mêmes tests, la présence des alcaloïdes, des terpènes des stérols et des flavonoïdes et autres composés phénoliques est également vérifiée dans les extraits bruts des trois plantes.

**II-4.1. Alcaloïdes** : Le test de Wagner a été réalisé pour déceler la présence des alcaloïdes dans les extraits bruts, la F2 et la F3. A cet effet, des aliquotes d'extrait brut

et des deux sous-fractions ont été dissoutes séparément dans 6ml d'HCl à 1%. Dans un bain marie, les deux solutions ont été bien agitées pendant 5 minutes et puis filtrées. A chacun des filtrats, quelques gouttes d'une solution préparée préalablement sont ajoutées. La composition pour 100ml d'eau distillée de cette solution est de 2g d'iodure de potassium et 1,27g d'iode. L'apparition d'un précipité de couleur brune indique la présence d'alcaloïdes (Joshi & *al.*, 2013).

**II-4.2. Terpènes :** la présence des terpènes dans les extraits bruts et la F4 a été vérifiée suivant le test de Salkowski (Iqbal & *al.*, 2015). Dans un tube à essai, quelques mg de la sous-fraction sèche sont dissous dans 2ml de chloroforme, puis additionner en agitant 2ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. L'apparition d'une coloration brun rougeâtre à l'interface entre les deux phases indique la présence de terpènes.

**II-4.3. Stérols :** Les stérols ont été mis en évidence dans les extraits bruts et les sous-fractions F4 suivant le test de Liebermann-Burchard. Dans un tube à essai, mettre quelques mg d'extrait ou de sous-fraction d'extrait secs, ajouter 1ml d'acide sulfurique concentré H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et bien mélanger. L'apparence de couleur vert rougeâtre foncé confirme la présence de stérols dans l'extrait ou dans la sous-fraction (Dhawan & Gupta, 2017).

**II-4.4. Flavonoïdes :** Les flavonoïdes ont été mis en évidence dans les extraits bruts et la F6 selon le test de Shinoda (Joshi & *al.*, 2013). Dans un tube à essai contenant 0,5 ml d'un filtrat aqueuse de la F6 ou de l'extrait brut, 10 gouttes d'acide chlorhydrique (HCl) et une petite pincée de magnésium sont additionnées. La formation de couleur rose rougeâtre à brune indique la présence de flavonoïdes.

**II-4.5. Autres composés phénoliques :** Dans un tube à essai, ajouter à 2ml du filtrat aqueux de chacun des extraits bruts et de la F6, quelques gouttes d'une solution d'acétate de plomb [Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O)]. L'apparition d'un précipité blanc indique la présence de composés phénoliques, y compris des tannins (Banso & Adeyemo, 2006).

## Chapitre III : Activité antifongique *in-vitro* des extraits végétaux

### III-1. Conduite des bioessais

L'activité antifongique des extraits végétaux bruts est évaluée à travers des mesures de la croissance mycélienne des quatre champignons, de leur sporulation et du taux de germination de leurs conidies. Le bioessai consiste à incorporer séparément dans le milieu de culture de chaque champignon des extraits bruts issus des huit espèces végétales. Un bioessai plus ou moins similaire est réalisé avec les sous-fractions des extraits jugés comme plus bioactifs à l'état brut.

**III-1.1. Bioessai aux extraits bruts :** Après stérilisation par filtration à travers des filtres seringue (Nylon 0,45µm, *Thermo Fisher Scientific™ Nalgene™*), les extraits bruts ont été additionnés aseptiquement et séparément aux milieux de culture en surfusion à trois doses différentes à savoir 1,5, 3 et 6% (p/v). A cet effet, 96 lots expérimentaux ont été constitués afin de cerner toutes les combinaisons de l'ensemble des traitements (8 extraits x 3 doses x 4 champignons = 96 lots). En plus des 96 lots, dont le milieu est additionné d'extraits végétaux, d'autres lots expérimentaux ont été également constitués, un lot témoin négatif pour chacune des espèces fongiques, le milieu de ces lots est exempt de tout extrait (dose nulle d'extrait).

Outre les lots témoins négatifs, un lot témoin dit témoin solvant est également constitué pour chaque champignon, ce milieu de culture est additionné d'éthanol à une dose de 3% (v/v), ce qui ramène le nombre total à 104 lots expérimentaux. Les lots témoins solvant sont constitués car les extraits végétaux sont incorporés aux milieux sous forme d'une solution aqueuse contenant 3% d'éthanol afin d'améliorer leur solubilité (Lattanzio & *al.*, 1994). En guise de répétition, chaque lot expérimental comporte cinq boîtes de Pétri de 9mm de diamètre dans chacune d'elles sont coulés 10 ml de milieu de culture.

**III-1.2. Bioessai aux sous-fractions d'extraits :** Parmi les six sous-fractions, seulement la F4 (terpènes et stérols), la F6 (substances acides, phénols et flavonoïdes) et un mélange de la F2 (alcaloïdes) et de la F3 (alcaloïdes quaternaires et sucres) sont testées. Tenant compte la parenté chimique entre alcaloïdes et alcaloïdes quaternaires, le mélange de la F2 et de la F3, baptisé F2-3, est permis.

Du point de vue méthodologique, ce bioessai est globalement similaire à celui réalisé aux extraits bruts. Néanmoins, les tests n'ont concerné que *A. rabiei*, agent de l'ascochytose du pois chiche et *A. pinodes*, considéré comme l'agent le plus important du complexe ascochyta causant l'ascochytose sur pois (Tran & *al.*, 2014a ; Barilli & *al.*, 2016).

De plus, les sous-fractions, issues des extraits de *A. alba*, de *L. arabicum* et de *P. harmala*, n'ont été incorporées aux milieux de culture qu'à 3%, dose considérée comme moyenne parmi les trois doses auxquelles les extraits bruts ont été appliqués, identiquement aux extraits bruts, les sous fractions sont également stérilisées aux filtres seringue.

Conformément à la même méthodologie suivie dans le cas des extraits bruts, l'effet *in-vitro* des sous-fractions des extraits a été évalué également sur la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des pycnidiospores des deux espèces fongiques.

### III-2. Effet des extraits végétaux sur la croissance mycélienne

L'action des extraits végétaux, appliqués aux doses susmentionnées, sur la croissance mycélienne de chacune des espèces fongiques étudiées, a été évaluée dans tous les lots expérimentaux suivant une méthode décrite par Cakir et *al.* (2005) et Mondal et *al.* (2005).

A l'aide d'une emporte pièce, des disques mycéliens de 5mm de diamètre chacun, pris aseptiquement de la périphérie croissante de la culture de chacun des quatre champignons (cultures monosporees âgées de 10 jours), sont déposés au centre des boîtes de Pétri, préalablement coulées avec 10 ml de milieu par boîte contenant ou non les extraits végétaux, les sous-fractions d'extraits ou l'éthanol. Les boîtes ensemencées sont incubées dans une chambre de culture à une température de  $20 \pm 1^\circ \text{C}$  et une photopériode de 12/12 (Tegegne & *al.*, 2008).

Lorsque les cultures fongiques des lots témoins négatifs atteignent les bords des boîtes, l'incubation est stoppée et la croissance mycélienne dans l'ensemble des boîtes est alors évaluée en mesurant au moins deux diamètres perpendiculaires de la colonie. Conformément à Amadioha (2000) et Dalili et *al.* (2015), l'effet des extraits végétaux ou de leurs sous-fractions sur la croissance mycélienne est estimé en déterminant le taux d'inhibition de la croissance par rapport aux traitements témoins négatifs suivant la formule ci-après.

$$\text{Taux d'Inhibition de la Croissance (TIC\%)} = \frac{D \text{ (mm)} - d \text{ (mm)}}{D \text{ (mm)}} \times 100$$

- *D* : Croissance mycélienne du témoin (mm)
- *d* : Croissance mycélienne du champignon subissant le traitement (mm)

### III-3. Effet des extraits végétaux sur la sporulation

Au terme des mesures de la croissance mycélienne, la sporulation de chacun des champignons est évaluée par comptage du nombre de spores dans chaque boîte des lots expérimentaux ayant subi les traitements aux extraits végétaux et des lots témoins.

Dans la boîte contenant la colonie de champignon, il est versé 10ml d'eau distillée stérile, 15 minutes après, la colonie est raclée superficiellement, à l'aide d'une tige en verre aseptisée, pour libérer les conidies. La suspension sporale obtenue est ensuite filtrée à travers quatre couches de compresse médicale stérile afin d'éliminer les particules mycéliennes.

Sur chaque suspension sporale, trois comptages de pycniospores sont réalisées sous microscope optique en utilisant l'hémocytomètre de Malassez. Le nombre de pycniospores obtenu est divisé par la surface de la colonie fongique pour le rapporter au cm<sup>2</sup> de colonie. L'effet des extraits végétaux sur la sporulation est mesuré via le taux d'inhibition de la sporulation (TIS) en rapportant le nombre de pycniospores par cm<sup>2</sup> de chacun des champignons à celui dans les lots témoins correspondants suivant la formule ci-après (Bautista-Baños & *al.*, 2004 ; Bahous & *al.*, 2005).

$$\text{Taux d'Inhibition de la Sporulation (TIS\%)} = \frac{S - s}{S} \times 100$$

- *S* : Nombre de spores du lot témoin ;
- *s* : Nombre de spores du lot subissant le traitement

### III-4. Effet des extraits végétaux sur la germination des conidies

L'effet des extraits végétaux sur la germination des pycniospores des quatre champignons étudiés est estimé via le taux d'inhibition de la germination comparativement à des lots témoins en adaptant une méthodologie décrite par Kishore et *al.* (2007) et Bowness & *al.* (2016).

Contrairement aux essais consacrés à la croissance mycélienne et la sporulation où les extraits végétaux ont été incorporés directement aux milieux de culture des champignons, dans le cas de la germination des conidies, les extraits sont additionnés aux suspensions conidiennes appartenant aux différentes espèces fongiques. Les suspensions conidiennes des différents champignons, obtenues de la même technique que dans le cas de l'évaluation de la sporulation, ont été ajustées à 10<sup>2</sup> spores par ml.

Aux suspensions, les extraits végétaux ainsi que leurs sous-fractions sont additionnés séparément aux doses appliquées précédemment. Parallèlement, des

suspensions conidiennes, à la même concentration sporale, sont également préparées en guise de témoins négatifs, exempts d'extraits végétaux et de témoins positifs solvant à 3% d'alcool éthylique. Les traitements aux extraits végétaux ou les traitements témoins, chacun est répété cinq fois.

Trente minutes après, des boîtes de Pétri, remplies préalablement de 10ml du milieu PDA, sontensemencées par 1ml par boîte de suspensions conidiennes issues des différents traitements y compris les traitements témoins. Les boîtesensemencées sont ensuite incubées dans une chambre de culture à une température de  $20\pm 1^{\circ}$  C pendant 48heures. Les conidies germées sont alors comptées sous une loupe binoculaire et rapportées aux cent conidies mises en culture afin de déduire le taux d'inhibition de la germination (TIG) suivant la formule ci-après (Bahous & *al.*, 2005 ; Mondal & *al.*, 2005 ; Uldahl & Knutsen, 2009).

$$\text{Taux d'inhibition de la germination (TIG\%)} = \frac{\text{Nombre de conidies germées}}{\text{Nombre de conidies mises en culture}} \times 100$$

## Chapitre IV : Activité antifongique *in-vivo* des extraits végétaux

### IV-1. Principe des bioessais

Les bioessais *in-vivo* ou *in-planta* visent à étudier l'effet des extraits végétaux bruts sur l'ascochytose provoquée artificiellement sur des plantes entières de pois chiche et des folioles détachées de pois en les inoculant par les agents causals respectifs de la maladie. Les tests consistent à appliquer, séparément et à différentes doses, des traitements aux extraits végétaux bruts issus de *A. alba* et de *P. harmala*. Le choix de ces deux extraits est dû surtout à leur activité antifongique meilleure dans les bioessais *in-vitro*, mais aussi aux rendements en extrait enregistrés avec ces deux espèces végétales.

L'efficacité *in-vivo* de ces deux extraits comme traitement contre l'ascochytose du pois chiche et du pois a été appréciée en évaluant leurs effets sur la durée d'incubation des pathogène, la durée de leur latence et la sévérité de la maladie.

### IV-2. Préparation des inocula

Les inocula appartenant aux quatre champignons, objet de tests, ont été tous préparés à partir de cultures monosporées âgées de 12 jours pour *A. rabiei* et de 15 jours pour les espèces fongiques du complexe *ascochyta i.e., A. pisi, A. pinodes* et *P. medicaginis var. pinodella*.

Conformément à Chen et *al.* (2004), Trapero-Casas et Kaiser (2007) et Barilli et *al.* (2016), la colonie du champignon en boîte est émergée d'eau courante stérile. 15 minutes après et à l'aide d'une raclette en verre aseptisée, les pycniospores sont délogées par raclage superficiel de la colonie et récupérées dans une fiole sous forme d'une suspension sporale après avoir été filtrées sur quatre couches de compresse médicale stérile. Les concentrations conidiennes sont alors déterminées avec l'hémocytomètre de Malassez.

La suspension conidienne de *A. rabiei*, destinée à inoculer les plantes de pois chiche, est ajustée avec de l'eau courante stérile à  $2.10^5$  conidies  $ml^{-1}$  (Tar'an & *al.*, 2007). S'agissant des suspensions de *A. pisi*, de *P. medicaginis var. pinodella* et de *A. pinodes*, elles sont ajustées respectivement à  $10^2$ ,  $10^2$  et  $10^3$  conidies  $ml^{-1}$ , avant qu'elles soient mélangées. Etant donnée que *A. pinodes* est considéré par l'ensemble des spécialistes comme le pathogène le plus important dans l'ascochytose du pois (Tivoli & Banniza, 2007 ; Tran & *al.*, 2016), la suspension conidienne destinée à l'inoculation des folioles du pois est préparée de telle sorte qu'il ait prédominance des conidies de cette espèce.

Juste avant utilisation, du Tween-20 (polyoxyethylene sorbitol monolaurate) est additionné à raison de 0,05% (v/v) à la suspension conidiennne de *A. rabiei* et au mélange des suspension des conidies des espèces du complexe ascochyta. Le Tween-20 est ajouté comme tensioactifs afin d'améliorer l'adhérence des conidies au végétal (Liu & *al.*, 2013).

### IV-3. Préparation des plantes du pois et du pois chiche

Les plantes du pois et du pois chiche sont cultivées dans des conditions contrôlées en chambre de culture sous une température de  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$  et une photopériode de 16/8. Le substrat de culture utilisé, suivant Garry et *al.* (1998) et Liu et *al.* (2013), est un mélange de 1/3 de sable et 2/3 de terreau (v/v). Avant utilisation, le substrat est désinfecté dans une étuve ventilée à  $70^{\circ}\text{C}$  pendant 30 minutes.

Afin d'éliminer la flore séminicole, les semences du pois chiche et du pois ont subi une désinfection de surface par émerision dans un bain à 1% d'hypochlorite de sodium (NaOCl) pendant 10 minutes, suivie de 4 rinçage dans des bains d'eau stérile et un séchage à l'air libre (Ahmed & *al.*, 2015). Le semis est réalisé dans des pots en plastique de forme carrée de  $42\text{cm}^2/8,5\text{cm}$  (section/hauteur) à raison de 5 graines par pot. Après émergence, un éclaircissage est réalisé pour ne laisser qu'un seul plant par pot (Figures 39 et 40).



Figure 39 : Plants de pois. Originale (2014)



Figure 40 : Plants de pois chiche. Original (2014)

#### IV-4. Inoculation

La maladie a été suivie différemment sur pois chiche et pois. A cet effet, deux techniques d'inoculation sont alors pratiquées selon la plante hôte.

**IV-4.1. Sur pois chiche :** L'inoculation est réalisée sur des plantes entières en pots au stade 4 à 6 feuilles (24 jours d'âge). A l'aide d'un pulvérisateur manuel, chaque plante est aspergée par 5 ml de suspension conidiennne de *A. rabiei*. Au terme de l'inoculation, les plantes sont mises en chambre de culture, réglée aux conditions suscitées, après avoir été enveloppées par des gobelets coniques en plastique pour assurer une humidité suffisante, nécessaire à l'infection (Barilli & *al.*, 2016). Les gobelets sont préalablement aspergés à leur intérieur d'eau distillée stérile avant utilisation (Figure 41). 48 heures après, les gobelets sont retirés. L'irrigation est effectuée à volonté et quand c'est nécessaire.

**IV-4.2. Sur pois :** Contrairement aux essais sur pois chiche, ceux sur pois ont été réalisés sur folioles détachées. A partir du 3<sup>ème</sup> et du 4<sup>ème</sup> étage des plantes de pois de 21 jours d'âge (Fondevilla & *al.*, 2005 ; Onfroy & Tivoli, 2005 ; Fondevilla & *al.*, 2011), des folioles de taille plus ou moins similaire sont coupées avec un ciseau stérilisé et mises dans des boîtes de Pétri, à raison de trois folioles par boîte, sur papier filtre stérile et imbibé de 4ml d'eau courante stérile (Figure 42).

Les folioles sont inoculées en déposant au centre de chacune une goutte de 15 $\mu$ l du mélange des suspensions sporales des trois espèces du complexe ascochyta. Les boîtes sont alors scellées et mises en chambre de culture sous les mêmes conditions appliquées aux plantes de pois chiche inoculées. Le papier filtre est imbibé quotidiennement par 1ml d'eau stérile afin d'assurer la continuité des conditions humides (Pretorius & *al.*, 2002).



**Figure 41 :** Plants de pois chiche après inoculation. Originale (2014)



**Figure 42 :** Folioles de pois après inoculation. Originale (2014)

## IV-5. Traitement aux extraits végétaux

Les extraits végétaux bruts de *A. alba* et de *P. harmala* ont été appliqués aux mêmes doses pratiquées dans le bioessai *in-vitro*, à savoir 1,5, 3 et 6% (p/v). Les extraits végétaux sont dissous séparément aux doses voulues dans de l'eau stérile contenant de l'éthanol à 3% (v/v).

Dans le but de déceler d'éventuels effets préventifs et/ou curatifs des extraits végétaux, deux bioessais différents par plante hôte sont réalisés (Tegegne & *al.*, 2008). Un bioessai dans lequel les traitements sont appliqués 24 heures avant inoculation et un deuxième pour lequel les traitements sont réalisés 48 heures après inoculation. Dans les deux cas, le traitement est effectué par aspersion en utilisant un pulvérisateur manuel.

**IV-5.1. Phytotoxicité des extraits végétaux :** la phytotoxicité d'un produit phytosanitaire ou d'un extrait végétal est un préalable primordial qu'il faut prendre en compte dans les bioessais *in-vivo* (Pretorius & *al.*, 2002 ; Tegegne & *al.*, 2008). Afin de déceler une éventuelle phytotoxicité des extraits végétaux, un lot de trois plantes du pois chiche et un autre de trois boîtes de Pétri, chacune contient trois folioles du pois ont subi séparément des traitements à fortes doses d'extrait (6%). Ces lots sont respectivement comparés aux lots traités au fongicide conventionnel et aux lots témoins dont les plantes et les folioles subissent un traitement à l'eau.

**IV-5.2. Bioessai sur pois chiche :** dans ce bioessai, 6 lots de 6 plantes de pois chiche chacun, prises comme répétition, ont été constitués pour qu'ils subissent séparément les traitements aux extraits végétaux issus de *A. alba* et de *P. harmala* aux doses susmentionnées (2 extraits x 3 doses = 6 lots). En plus de ces lots, quatre autres lots, de 6 plantes chacun, sont également constitués. Un lot pris comme témoin positif dans lequel les plantes sont traitées à l'Amistar-Top® (*Syngenta Crop Protection*), un fongicide conventionnel de plus en plus utilisé dans le traitement de maladies foliaires. La formulation de ce fongicide associe deux matières actives *i.e.* 200gL<sup>-1</sup> d'Azoxystrobine et 125 g L<sup>-1</sup> de Difenoconazole (Amin & Melkamu, 2014), le fongicide a été appliqué sous forme d'une solution aqueuse à 0,05 g L<sup>-1</sup> de matière active (Keinath, 2009).

Comme témoin solvant, un lot de plantes a été traité à l'eau contenant de l'éthanol à 3% et un autre traité à l'eau contenant du Tween-20 à 0,05%. Un dernier lot, pris comme témoin négatif et constitué aussi de 6 plantes qui n'ont subi ni inoculation au pathogène ni traitement fongicide.

**IV-5.3. Bioessai sur pois :** Le même protocole en matière de lots constitués et de traitements appliqués a été adopté dans le bioessai sur folioles de pois. A cet effet, chaque lot expérimental comporte 6 boîtes de Pétri en guise de répétition, avec trois folioles par boîte. Il est à noter également que dans le cas des tests où l'inoculation succède aux traitements, ces derniers ont été effectués sur des plantes de pois entières avant que les folioles soient coupées, mises en boîtes et inoculées.

#### **IV-6. Effet des extraits végétaux sur la durée d'incubation**

En pathologie des plantes, la durée d'incubation d'un agent pathogène est définie comme étant le temps écoulé entre l'inoculation ou la contamination et l'apparition des premiers symptômes (Barnes, 1979 ; Agrios, 2005 ; Madden & *al.*, 2007).

Dans nos essais, la durée d'incubation de *A. rabiei* et du complexe ascochyta sur pois chiche et sur pois respectivement, est déterminée en heure post inoculation (hpi) selon Suffert & Thompson (2018).

Partant du moment de l'inoculation, des inspections visuelles des plantes de pois chiche et des folioles de pois, sont réalisées et ce jusqu'à l'apparition des premiers symptômes (Basandrai & *al.*, 2007). Que se soit sur pois ou sur pois chiche, l'évaluation de la durée d'incubation n'a concerné que des lots subissant des traitements aux extraits, à l'éthanol ainsi que des traitements témoins inoculés.

#### **IV-7. Effet des extraits végétaux sur la durée de latence**

La durée ou la période de latence est le délai entre la contamination ou l'inoculation et la production ou l'apparition des premières nouvelles propagules infectieuses du pathogène qui, dans les épidémies polycycliques, constituent l'inoculum secondaire (Strange & Scott, 2005 ; Cooke, 2006). Ce paramètre, considéré comme l'une des principales composante de l'agressivité d'un agent phytopathogène, trouve son importance surtout dans le cas des maladies polycycliques, telle l'ascochytose des légumineuses, où il nous renseigne sur la durée et le nombre des cycles épidémiques (Suffert & Thompson, 2018).

Comme pour la détermination de la période d'incubation, des inspections quotidiennes à une loupe à main sont effectuées (les inspections en vue de déceler la présence des pycnides débute dès que les symptômes apparaissent). Dès l'apparition des pycnides, le temps écoulé à partir de l'inoculation est compté et la période de latence est ainsi déterminée en hpi sur les mêmes lots pour lesquels la durée d'incubation est évaluée.

## IV-8. Effet des extraits végétaux sur la sévérité de la maladie

L'effet des extraits végétaux bruts sur l'ascochytose du pois chiche et du pois a été évalué à travers des mesures de la sévérité de la maladie. Des échelles préétablies ont été utilisées pour transformer la nature qualitative des observations visuelles en notations quantitatives (Pande & *al.*, 2010).

**IV-8.1. Sévérité de l'ascochytose sur pois chiche :** La sévérité de la maladie sur pois chiche est estimée suivant une échelle que nous l'avons adapté de celles de Singh et *al.* (1981) et Nene & *al.* (1981). Il s'agit d'une échelle de notation allant de 1 à 9 point (Figure 43), où **1** = aucune lésion visible sur aucune plante (très résistant); **3** = Lésions visibles sur moins de 10% des plantes, pas de ceinturement de la tige (résistant); **5** = lésions visibles sur une moyenne de 25% des plantes avec très peu de dommages (tolérant); **7** = lésions sur la plupart des plantes, tige ceinturée sur moins de 50% des plantes entraînant la mort de quelques plantes (sensible); **9** = Les lésions abondantes sur toutes les plantes, tige ceinturée sur plus de 50% des plantes et la mort de la plupart des plantes (très sensible).

Il est d'usage de ne pas prendre en compte les notations paires (2, 4, 6 et 8), car chacune d'elles est plus ou moins semblable à la notation qui la précède ou la succède en plus de la difficulté de déceler visuellement les différences (Chongo & *al.*, 2004).

**IV-8.2. Sévérité de l'ascochytose sur pois :** La sévérité de l'ascochytose sur pois est évaluée en se basant sur l'échelle de Roger et Tivoli (1996). C'est une échelle de 5 notations (0 à 5), elle est conçue pour l'estimation de la symptomatologie sur feuilles et gousses (Figure 44). Les notations sont attribuées en tenant compte du rapport de la surface des taches nécrotiques à la surface de la feuille ou de la gousse. Les cinq notations de cette échelle sont comme suit : **0**= pas de lésions; **1**= quelques taches éparses; **2**= nombreuses mouchetures; **3** = 25% de la surface des feuilles ou des gousses recouverte de petites lésions coalescées; **4** = 26–75% de la surface des feuilles ou des gousses couvertes par de grandes lésions coalescées; **5** = taches couvrant 76–100% de la surface des feuilles ou celle des gousses.

Sur folioles détachées, la surface des nécroses est déterminée en mesurant au moins deux diamètres perpendiculaires de la tache. Le pourcentage de cette surface est alors calculé par rapport à la surface foliaire que nous l'avons mesuré à l'aide d'un planimètre foliaire (*LAI-mètre ADC BioScientific Ltd., AM300-002*).

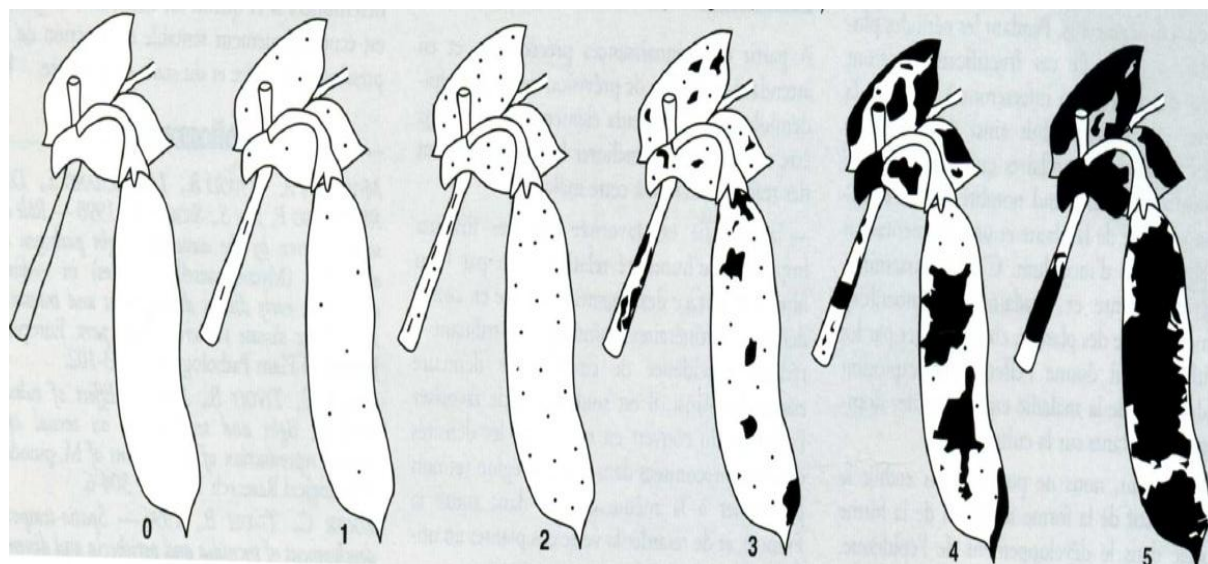
Que se soit sur pois ou sur pois chiche, la sévérité de la maladie est évaluée via la détermination de l'indice de maladie ou *DI* (*Disease Index*) conformément à Cooke (2006). Les notations, prises au 18<sup>ème</sup> jour succédant l'inoculation (18 dpi) sont utilisées pour quantifier le *DI* suivant la formule de Scott et Hollins (1974), développée ci-après.

$$\text{Disease Index (DI)} = \frac{\sum_{i=1}^n (n_i \times i)}{N \times I}$$

$n_i$ : Notation attribuée (de 1 à 9 pour sur pois chiche et de 0 à 5 sur pois) ;  $i$ : Nombre de plantes ayant la notation  $i$  ;  
 $N$ : Nombre total de plantes ;  $I$ : Notation maximale de l'échelle (9 sur pois chiche et 5 sur pois).



**Figure 43** : Echelle de notation des symptômes de l'ascochytose du pois chiche. Chongo & al. (2004).



**Figure 44 :** Echelle de notation des symptômes de l'ascochytose du pois. Roger & *al.* (1998).

## Chapitre V : Traitement statistique des résultats

### V-1. Analyse de la variance et comparaison des moyennes

Les résultats issus de l'ensemble des bioessais ont subi des traitements statistiques en utilisant le software SAS, pour *Statistical Analysis System (SAS System 9.4, SAS Institute Inc.)*. Les effets des différents traitements ou de leurs interactions ont fait l'objet d'analyse de variance (*ANOVA*) des données relatives aux différentes variables mesurées. Si nécessaire, le test de Newman et Keuls au seuil de 5% est appliqué pour la comparaison des moyennes des différents traitements (Vessereau, 1992).

### V-2. Dispositifs statistiques

Différents dispositifs statistiques sont adoptés. Un dispositif à trois critères de classification (tri-factoriel en randomisation totale avec répétitions) a été adopté pour l'analyse de variance relative aux variables croissance mycélienne, sporulation et germination des conidies (Tableau 09), variables mesurées dans les tests *in-vitro* des extraits végétaux bruts. Les critères de classification sont : (i) le type d'extrait végétal (origine botanique) avec huit modalités en plus des traitements éthanol et témoin ; (ii) la dose de l'extrait avec trois niveaux ; (iii) l'espèce fongique avec quatre modalités.

**Tableau 09** : Dispositif statistique relatif au bioessai *in-vitro* des extraits végétaux bruts.

| Facteur 1 (F1)              |                      |                   |                    |                   |                     |                   |                       |         |        | Facteur 2 (F2) |       |       | Facteur 3 (F3)   |                |                   |                     |
|-----------------------------|----------------------|-------------------|--------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-----------------------|---------|--------|----------------|-------|-------|------------------|----------------|-------------------|---------------------|
| Type d'extrait (Traitement) |                      |                   |                    |                   |                     |                   |                       |         |        | Dose d'extrait |       |       | Espèce fongique  |                |                   |                     |
| Md 1                        | Md 2                 | Md 3              | Md 4               | Md 5              | Md 6                | Md 7              | Md 8                  | Md 9    | Nv 1   | Nv 2           | Nv 3  | Nv 4  | Md 1             | Md 2           | Md 3              | Md 4                |
| <i>A. alba</i>              | <i>A. campestris</i> | <i>C. arabica</i> | <i>L. arabicum</i> | <i>P. harmala</i> | <i>T. gorganica</i> | <i>T. hirsuta</i> | <i>T. microphylla</i> | Ethanol | Témoin | 1,5 %          | 3,0 % | 6,0 % | <i>A. rabiui</i> | <i>A. pixi</i> | <i>A. pinodes</i> | <i>A. pinodella</i> |

Md : Modalité ; Nv : Niveau.

Quant au bioessai de l'effet des sous-fractions d'extraits sur la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des conidies, le dispositif adopté est un bi-factoriel randomisé avec répétitions (Tableau 10). Les critères de classification sont : (i) le type de traitement avec 12 modalités en plus d'un traitement à l'éthanol et un traitement témoin ; (ii) l'espèce fongique avec deux modalités.

S'agissant des bioessais *in-vivo*, un dispositif randomisé à deux facteurs étudiés (bi-factoriel avec répétitions) a été appliqué aux tests des extraits bruts sur pois chiche et

sur folioles de pois (Tableau 11). Les deux facteurs étudiés sont : (i) le type de traitement avec dix modalités ; (ii) le temps de traitement avec deux modalités. La variable mesurée est la sévérité de l'ascochytose exprimée *DI* (*Disease Index*). Quant aux variables durée d'incubation et durée de latence, le dispositif adopté est le même que celui de la variable sévérité, mais avec un facteur type de traitement à huit modalités au lieu de dix (Tableau 12).

**Tableau 10 :** Dispositif statistique relatif au bioessai *in-vitro* des sous-fractions d'extraits.

| Facteur 1 (F1)     |                 |                 |                   |                |                 |                 |                   |                |                 |                 |                   |                |                       | Facteur 2 (F2)   |                   |
|--------------------|-----------------|-----------------|-------------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------------|----------------|-----------------------|------------------|-------------------|
| Type de traitement |                 |                 |                   |                |                 |                 |                   |                |                 |                 |                   |                |                       | Espèce fongique  |                   |
| Md 1               | Md 2            | Md 3            | Md 4              | Md 5           | Md 6            | Md 7            | Md 8              | Md 9           | Md 10           | Md 11           | Md 12             | Md 13          | Md 14                 | Md1              | Md 2              |
| <i>Eb A. a</i>     | <i>F 4 A. a</i> | <i>F 6 A. a</i> | <i>F 2-3 A. a</i> | <i>Eb L. a</i> | <i>F 4 L. a</i> | <i>F 6 L. a</i> | <i>F 2-3 L. a</i> | <i>Eb P. b</i> | <i>F 4 P. b</i> | <i>F 6 P. b</i> | <i>F 2-3 P. b</i> | <i>Ethanol</i> | <i>Témoin négatif</i> | <i>A. rabiei</i> | <i>A. pinodes</i> |

*Md* : Modalité ; *Eb* : Extrait brut ; *A. a* : *A. alba* ; *L. a* : *L. arabicum* ; *P. b* : *P. barmala*.

**Tableau 11 :** Dispositif statistique relatif aux bioessais *in-vivo*.

| Facteur 1 (F1)         |                      |                      |                           |                         |                         |           |         |                   |                   | Facteur 2 (F2)       |                      |
|------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------|---------|-------------------|-------------------|----------------------|----------------------|
| Type de traitement     |                      |                      |                           |                         |                         |           |         |                   |                   | Temps de traitement  |                      |
| Md1                    | Md 2                 | Md 3                 | Md 4                      | Md 5                    | Md 6                    | Md 7      | Md 8    | Md 9              | Md 10             | Md 1                 | Md 2                 |
| <i>A. alba</i><br>1,5% | <i>A. alba</i><br>3% | <i>A. alba</i><br>6% | <i>P. barmala</i><br>1,5% | <i>P. barmala</i><br>3% | <i>P. barmala</i><br>6% | Fongicide | Ethanol | Témoin<br>inoculé | Témoin<br>négatif | Avant<br>inoculation | Après<br>inoculation |

*Md* : Modalité.

**Tableau 12 :** Dispositif statistique relatif aux variables durée d'incubation et durée de latence.

| Facteur 1 (F1)         |                      |                      |                           |                         |                         |         |                   | Facteur 2 (F2)       |                      |
|------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|---------|-------------------|----------------------|----------------------|
| Type de traitement     |                      |                      |                           |                         |                         |         |                   | Temps de traitement  |                      |
| Md 1                   | Md 2                 | Md 3                 | Md 4                      | Md 5                    | Md 6                    | Md 8    | Md 9              | Md 1                 | Md 2                 |
| <i>A. alba</i><br>1,5% | <i>A. alba</i><br>3% | <i>A. alba</i><br>6% | <i>P. barmala</i><br>1,5% | <i>P. barmala</i><br>3% | <i>P. barmala</i><br>6% | Ethanol | Témoin<br>inoculé | Avant<br>inoculation | Après<br>inoculation |

*Md* : Modalité.

# *Troisième partie* : **Résultats et discussion**

*Chapitre I* : **Phytochimie**

*Chapitre II* : **Activité antifongique *in-vitro* des extraits végétaux**

*Chapitre III* : **Activité antifongique *in-vivo* des extraits végétaux**

## Chapitre I : Phytochimie

### I-1. Rendement en extraits

Les rendements en extraits bruts de l'ensemble des espèces végétales étudiées sont répertoriés dans le tableau 13.

**Tableau 13 :** Rendement en extraits végétaux bruts.

| Espèce végétale                            | Rendement (%) |
|--|---------------|
| <i>Artemisia alba</i> Turra                | 13,96         |
| <i>Artemisia campestris</i> L.             | 08,21         |
| <i>Cleome arabica</i> L.                   | 06,76         |
| <i>Lycium arabicum</i> Schweinf. ex-Boiss. | 14,69         |
| <i>Peganum harmala</i> Linn.               | 11,88         |
| <i>Thapsia garganica</i> L.                | 07,83         |
| <i>Thymelaea hirsuta</i> (L.) Endl.        | 18,56         |
| <i>Thymelaea microphylla</i> Coss. & Dur.  | 16,34         |

L'analyse des résultats relatifs au rendement en extraits végétaux bruts des huit plantes montre clairement que pour les mêmes conditions d'extraction, la quantité d'extrait obtenue varie amplement d'une espèce végétale à une autre. A cet effet, un ordre décroissant des rendements nous a permis de classer les huit plantes comme suit : *T. hirsuta* > *T. microphylla* > *L. arabicum* > *A. alba* > *P. harmala* > *A. campestris* > *T. garganica* > *C. arabica*. Les meilleurs rendements sont de l'ordre de 18,56 et 16,34%, enregistrés respectivement avec *T. hirsuta* et *T. microphylla* alors que, *T. garganica* et *C. arabica* ont enregistré les rendements les plus faibles avec 7,83 et 6,76% respectivement.

L'obtention d'un extrait végétal passe par plusieurs étapes telles que la mouture ou le broyage, l'homogénéisation et l'extraction, cette dernière est considérée comme la principale étape de la récupération d'extrait à partir de matières végétales (Stalikas, 2007). L'efficacité d'un procédé d'extraction, qui s'évalue surtout à travers le rendement en extrait, dépend de la nature chimique de la matière extractible (composés phytochimiques), du solvant et de sa polarité, de la température et de la durée d'extraction. Pour un même temps et une même température d'extraction, la composition du végétal et le solvant sont les paramètres les plus importants qui influencent les rendements (Do & al., 2014).

L'utilisation du procédé Soxhlet et de l'éthanol comme solvant dans l'extraction nous ont permis de réaliser des rendements en extrait plus ou moins

comparables à ceux obtenus dans les mêmes conditions d'extraction à partir de *Mentha spicata* L. (*Lamiaceae*) par Bimakr et al. (2011), de *Bougainvillea × buttiana* Holttum & Standl (*Nyctaginaceae*) par Abarca-Vargas et al. (2016) et de *Severinia buxifolia* (Poir.) Ten. (*Rutaceae*) par Truong et al. (2019). Les mêmes auteurs rapportent que les rendements en extraits végétaux sont proportionnels à la polarité du solvant et considèrent par ailleurs l'éthanol comme l'un des meilleurs solvants après l'eau et le méthanol en matière d'extraction de composés phytochimiques. Bimakr et al. (2011), avancent que les constituants polaires de la matrice végétale seraient plus faciles à extraire avec un solvant de polarité élevée alors que, les solvants de polarité inférieure permettraient d'extraire les composés végétaux à forte concentration dans le matériel végétal.

## I-2. Screening phytochimique

Le screening phytochimique des extraits bruts de *A. alba*, de *L. arabicum* et de *P. harmala*, réalisé dans le but de vérifier la présence de quelques phytoconstitués issus du métabolisme secondaire et doués éventuellement d'activité antifongique, nous a permis de mettre en évidence la présence d'alcaloïdes, de terpènes, de stérols, de flavonoïdes et autres composés phénoliques dans les trois extraits. Par ailleurs, les tests visant la mise en évidence des quatre groupes de composés suscités dans les sous-fractions F2, F3, F4 et F6, issues de chacun des trois extraits bruts, nous ont permis également de confirmer la présence d'alcaloïdes dans la F2 et la F3 appartenant aux trois extraits et il en était de même concernant les terpènes et les stérols dans la F4 et les flavonoïdes ainsi que d'autres composés phénoliques dans la F6 (Tableau 14).

**Tableau 14 :** Tests phytochimiques.

|                    |    | Alcaloïdes | Terpènes | Stérols | Flavonoïdes | Autres composés phénoliques |
|--------------------|----|------------|----------|---------|-------------|-----------------------------|
| <i>A. alba</i>     | Eb | +          | +        | +       | +           | +                           |
|                    | F2 | +          |          |         |             |                             |
|                    | F3 | +          |          |         |             |                             |
|                    | F4 |            | +        | +       |             |                             |
|                    | F6 |            |          |         | +           | +                           |
| <i>L. arabicum</i> | Eb | +          | +        | +       | +           | +                           |
|                    | F2 | +          |          |         |             |                             |
|                    | F3 | +          |          |         |             |                             |
|                    | F4 |            | +        | +       |             |                             |
|                    | F6 |            |          |         | +           | +                           |
| <i>P. harmala</i>  | Eb | +          | +        | +       | +           | +                           |
|                    | F2 | +          |          |         |             |                             |
|                    | F3 | +          |          |         |             |                             |
|                    | F4 |            | +        | +       |             |                             |
|                    | F6 |            |          |         | +           | +                           |

Eb : Extrait brut ; F2, F3, F4, F6 : Sous-fractions ; + : Présence ; Cellule vide : Test non réalisé

La présence des principales substances végétales, dont la bioactivité est reconnues, dans les extraits bruts de *A. alba*, de *L. arabicum* et de *P. harmala* confirme d'avantage l'efficacité du système d'extraction et de l'éthanol comme solvant pour extraire ce type de substances. Une telle efficacité est également constatée par Dhawan et Gupta (2017) dans une étude comparative de plusieurs méthodes d'extraction et de solvants dont l'éthanol, utilisés afin d'extraire des substances bioactives à partir du métel (*Datura metel*, *Solanaceae*).

D'autre part, la partition des différents composants des extraits végétaux bruts entre les différentes sous-fractions appuie l'efficacité du procédé de fractionnement. L'utilisation de solvants à différentes polarité a permis de séparer les différents groupes de phytocomposés. Cette séparation des composés bioactifs est un avantage pour pouvoir les tester séparément et réduire ainsi les interférences entre constituants chimiques, car les composés présents en mélange dans les extraits bruts peuvent parfois s'interférer et influencer la bioactivité (Jeyaseelan & *al.*, 2011 ; Iqbal & *al.*, 2015).

## Chapitre II : Activité antifongique *in-vitro* des extraits végétaux

### II-1. Résultats

#### II-1-1. Bioessais aux extraits végétaux bruts

Les bioessais réalisés aux extraits végétaux bruts de *Artemisia alba*, *Artemisia campestris*, *Cleome arabica*, *Lycium arabicum*, *Peganum harmala*, *Thapsia garganica*, *Thymelaea hirsuta* et *Thymelaea microphylla*, consistent à une évaluation de l'effet de leur introduction à différentes doses dans le milieu de culture sur la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des pycnidiospores de *Ascochyta rabiei*, agent de l'ascochytose du pois chiche et sur celles de *Ascochyta pinodes*, *Phoma medicaginis* var. *pinodella* et *Ascochyta pisi* agents causals de l'ascochytose du pois.

##### II-1-1-1. Effet des extraits végétaux bruts sur la croissance mycélienne

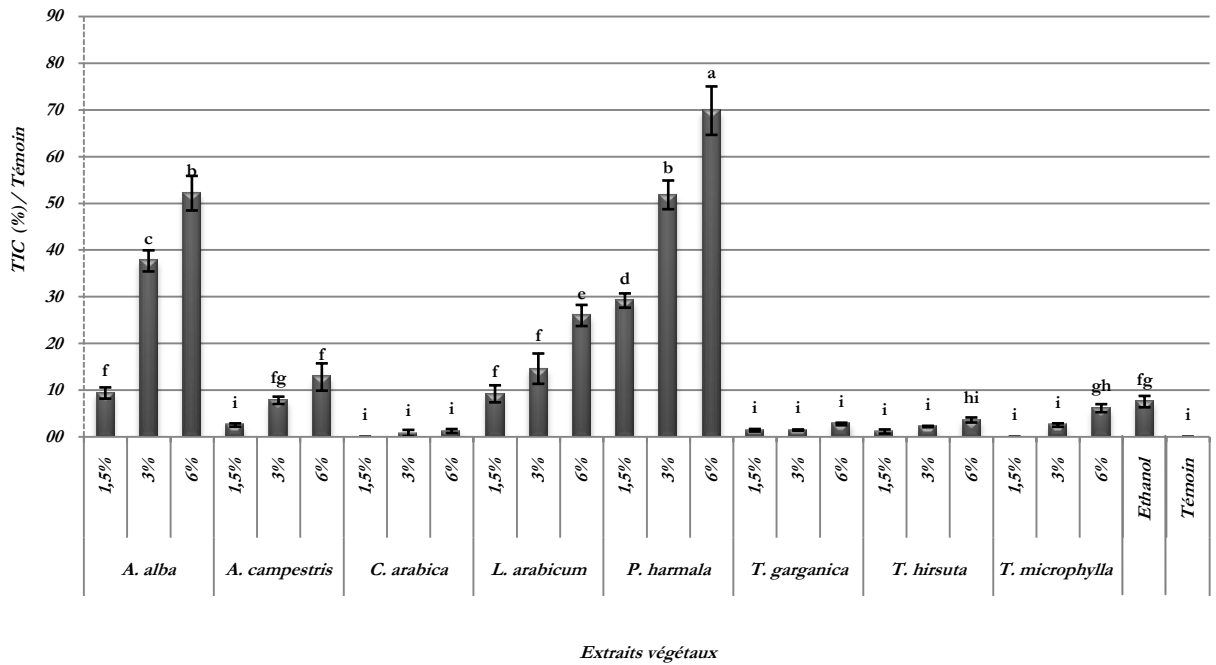
Les effets des extraits végétaux bruts des huit plantes susmentionnées sur la croissance mycélienne de *A. rabiei*, de *A. pinodes*, de *P. medicaginis* var. *pinodella* et de *A. pisi*, évalués via le taux d'inhibition de la croissance (TIC) aux doses de 1,5, 3 et 6%, sont représentés respectivement dans les figures 45, 46, 47 et 48.

De ces résultats, il apparaît clairement que l'effet des extraits végétaux bruts sur la croissance mycélienne des quatre champignons varie amplement suivant le type d'extrait. Les différences enregistrés à ce sujet sont très significatives (probabilité,  $P < 0,01$ ). Elles laissent noter aussi que les meilleurs taux d'inhibition sont ceux qui découlent des traitements à l'extrait de *P. harmala* suivie de ceux de *A. alba* et de *L. arabicum*.

S'agissant du facteur dose d'extrait, l'analyse des résultats montre que pour l'ensemble des traitements, l'action inhibitrice de la croissance augmente proportionnellement et d'une manière significative avec l'augmentation de la dose appliquée ( $P < 0,01$ ). Les pourcentages d'inhibition les plus importants sont enregistrés avec une dose d'extrait de 6%. La comparaison des moyennes issues de l'effet de l'interaction type et dose d'extraits sont significativement différentes.

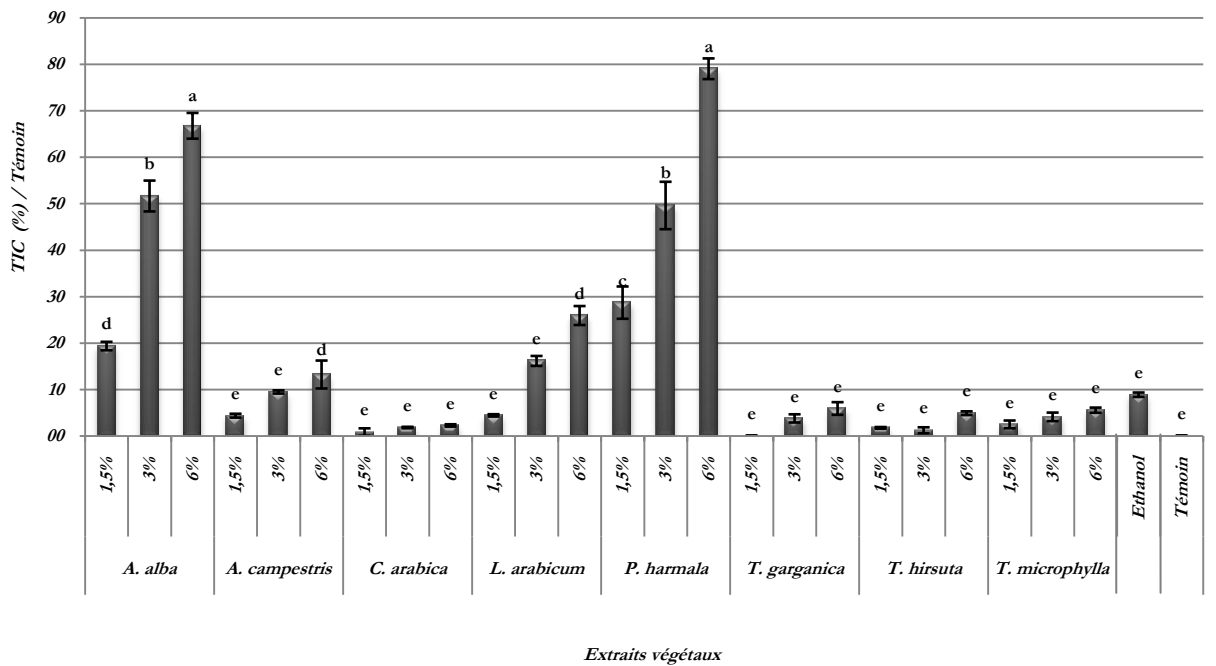
Quant à l'effet espèce fongique, l'analyse statistique des résultats et la comparaison des moyennes générées par ce facteur, dégagent un effet hautement significatif ( $P < 0,01$ ). Ces résultats montrent que *A. pisi* s'est distingué comparativement aux autres espèces par sa forte sensibilité à l'ensemble des traitements. Le taux d'inhibition de sa croissance mycélienne oscille entre 21%, lorsqu'il est cultivé dans un

milieu contenant 1,5% d'extrait de *T. hirsuta* et 71% en moyenne lorsqu'il est confronté à cette même dose de l'extrait de *A. alba*. A une concentration de 3% d'extrait de *P. harmala* ou de *A. alba*, sa croissance est réduite de plus de 90%, alors qu'elle est complètement stoppée dans un milieu contenant 6% des mêmes extraits.



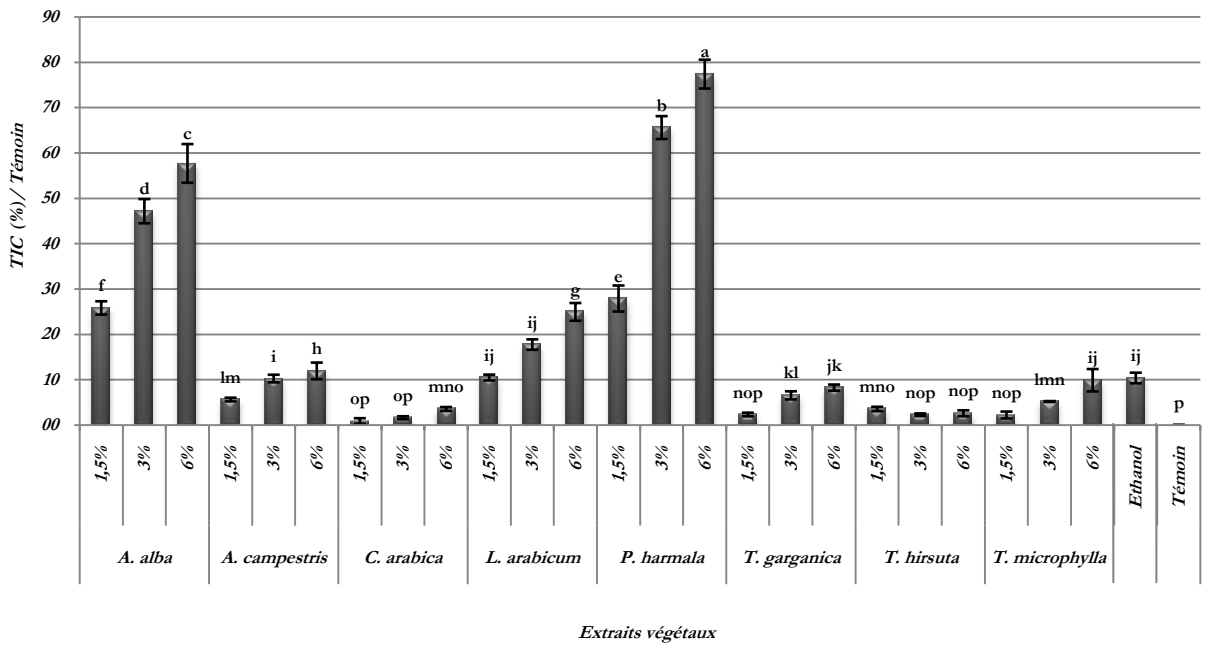
TIC : Taux d'inhibition de la croissance / témoin, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour n = 5, Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

Figure 45 : Effet des extraits végétaux bruts sur la croissance mycélienne de *A. rabei*.



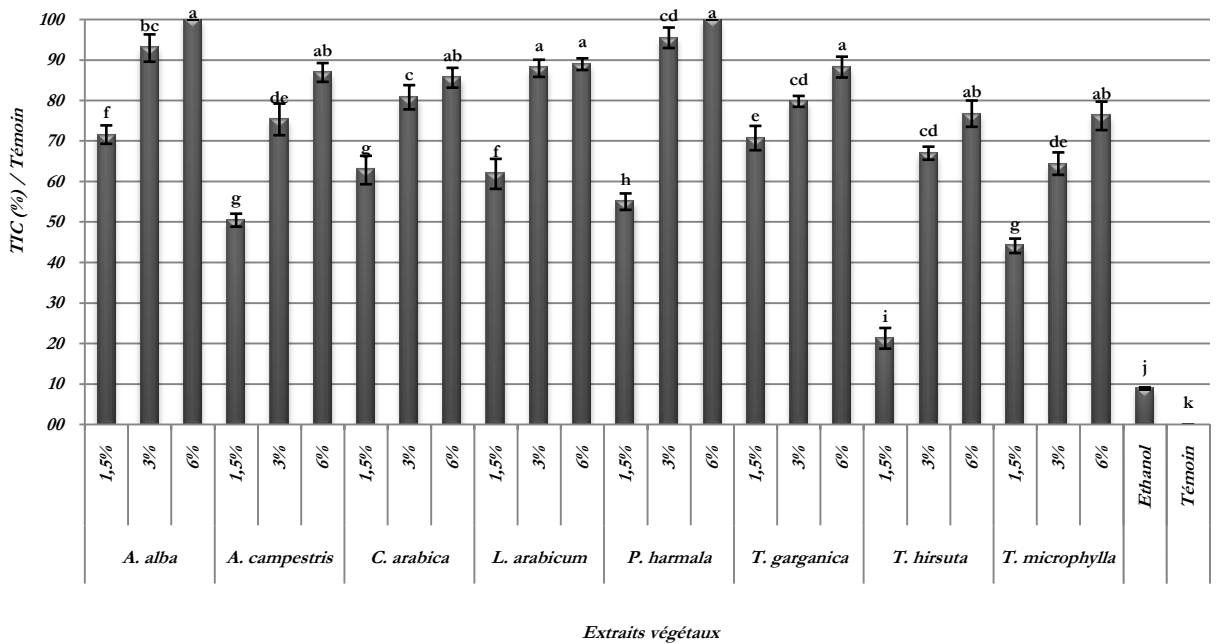
TIC : Taux d'inhibition de la croissance / témoin, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour n = 5, Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

Figure 46 : Effet des extraits végétaux bruts sur la croissance mycélienne de *A. pinodes*.



TIC : Taux d'inhibition de la croissance / témoin, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour n = 5, Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

**Figure 47 :** Effet des extraits végétaux bruts sur la croissance mycélienne de *P. medicaginis var. pinodella*.



TIC : Taux d'inhibition de la croissance / témoin, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour n = 5, Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

**Figure 48 :** Effet des extraits végétaux bruts sur la croissance mycélienne de *A. pisi*.

En ce qui concerne les trois autres espèces, les figures 43, 44 et 45 laissent constater que leur comportement vis-à-vis des traitements appliqués est globalement similaire en dépit de légères différences dans les taux d'inhibition de la croissance. Comparativement au traitement témoin, *A. rabiei* trouve sa croissance réduite de 70% en moyenne sous l'effet de 6% d'extrait de *P. harmala* dans le milieu contre des taux qui

frôlent les 80% à la même dose du même extrait lorsqu'il s'agit de *A. pinodes* et *P. medicaginis* var. *pinodella*. A des traitements similaires à l'extrait de *A. alba*, la croissance de *A. rabiei* est réduite de plus de la moitié, tandis que celles de *A. pinodes* et *P. medicaginis* var. *pinodella* accusent une inhibition avoisinant les 70 et 60% respectivement.

A faible dose, 1,5% en l'occurrence, l'extrait de *P. harmala* s'est montré plus efficace que celui de *A. alba* en inhibant la croissance des trois espèces d'un taux moyen dépassant les 28%. En revanche, l'extrait de *A. alba* appliqué à la même dose, n'inhibe la croissance de *A. rabiei* que de 10% contre 20 et 25% en moyenne dans le cas de *A. pinodes* et *P. medicaginis* var. *pinodella*, respectivement. Par ailleurs, il est à constater qu'à 3% d'extrait dans le milieu, *P. harmala* réduit de moitié la croissance de *A. rabiei* et *P. medicaginis* var. *pinodella*, alors que celle de *A. pinodes* est réduite de plus de 65%. Dans le cas de l'extrait de *A. alba*, appliqué à la même dose, c'est *A. pinodes* qui s'est montré plus sensible que *P. medicaginis* var. *pinodella* et *A. rabiei*, en enregistrant un taux moyen avoisinant les 50% contre des taux respectifs de 47 et 38% pour le deux autres champignons.

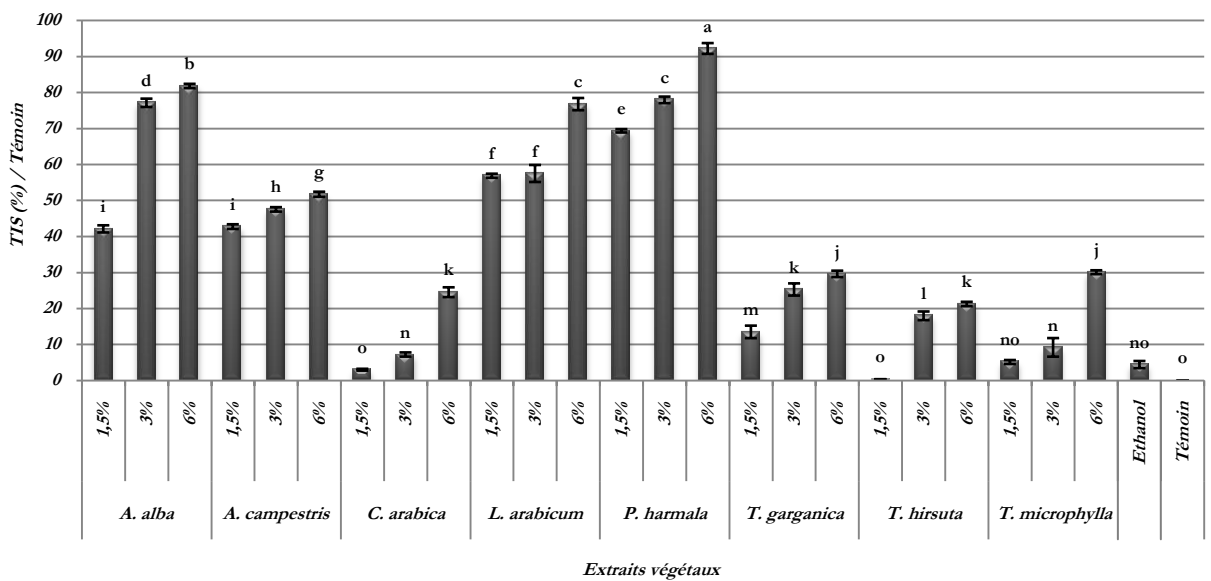
En dehors des extraits de *P. harmala* et de *A. alba*, c'est avec l'extrait de *L. arabicum* que des taux d'inhibition relativement appréciables sont enregistrés. La présence de 1,5% de cet extrait dans le milieu a pu limiter la croissance de *A. rabiei* et de *P. medicaginis* var. *pinodella* à des taux d'inhibition moyens qui s'approche de 10%. A la même dose, *A. pinodes* trouve sa croissance inhibée de plus de 16% comparativement à la croissance d'une culture témoin. A 3% du même extrait, les taux d'inhibition oscillaient entre 14,62% pour *A. rabiei* et 26% pour *A. pinodes* en passant par 16% dans le cas de *P. medicaginis* var. *pinodella*.

L'addition de cet extrait au milieu de culture à une dose de 6%, a permis l'enregistrement des taux d'inhibition de croissance plus meilleurs et qui avoisinent les 25% en moyenne. Quant à *A. pisi*, l'effet de cet extrait sur sa croissance s'est avéré très remarquable. En effet, à 1,5% l'action inhibitrice s'affichait à 62%, alors qu'à 3 et 6%, les taux d'inhibition effleuraient les 90%.

### **II-1-1-2. Effet des extraits végétaux bruts sur la sporulation**

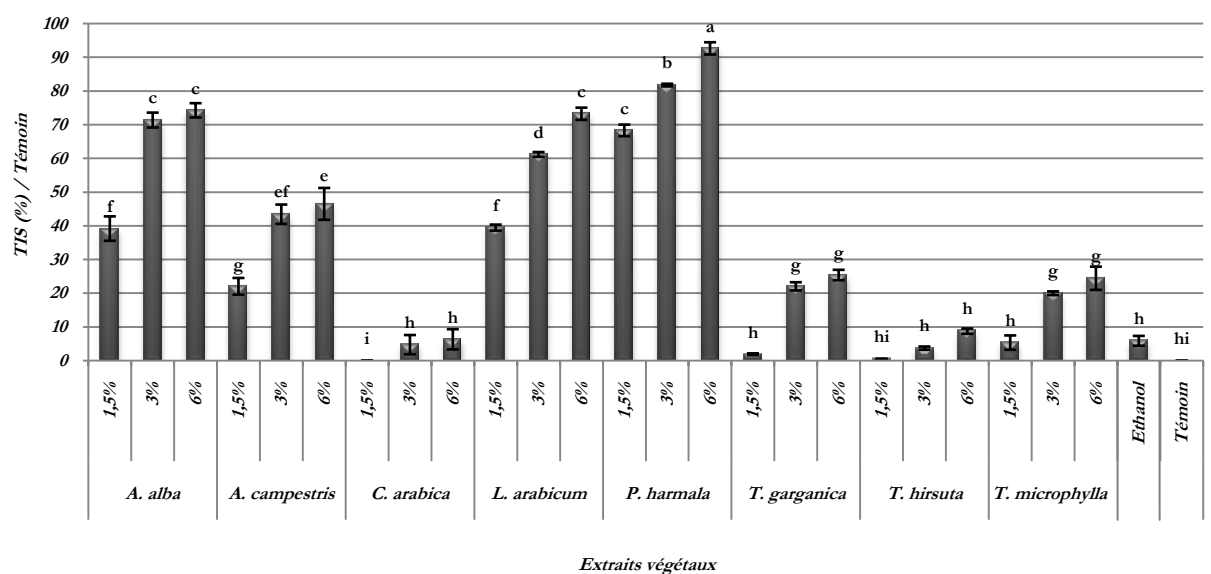
Les figures 49, 50, 51 et 52 illustrent les résultats de l'effet des extraits végétaux bruts étudiés sur la sporulation de *A. rabiei*, *A. pinodes*, *P. medicaginis* var. *pinodella* et *A. pisi*. Cet effet est exprimé au taux d'inhibition de la sporulation (TIS) par rapport aux traitements témoins.

Identiquement à l'effet des extraits végétaux bruts sur la croissance mycélienne des quatre agents phytopathogènes, l'analyse de la variance des résultats relatifs au taux d'inhibition de la sporulation (TIS) fait ressortir des effets significatifs ( $P < 0,01$ ) de l'ensemble des facteurs étudiés, à savoir le type de l'extrait, sa dose ainsi que le facteur espèce fongique, les écarts entre les moyennes des différents traitements sont également significatifs. D'autre part, la dose de l'extrait a beaucoup influencé le taux d'inhibition de la sporulation de telle sorte que ce taux augmente graduellement avec l'augmentation de la dose, quelque soit l'extrait. A cet effet, les meilleurs taux d'inhibition sont enregistrés avec la dose la plus élevée.



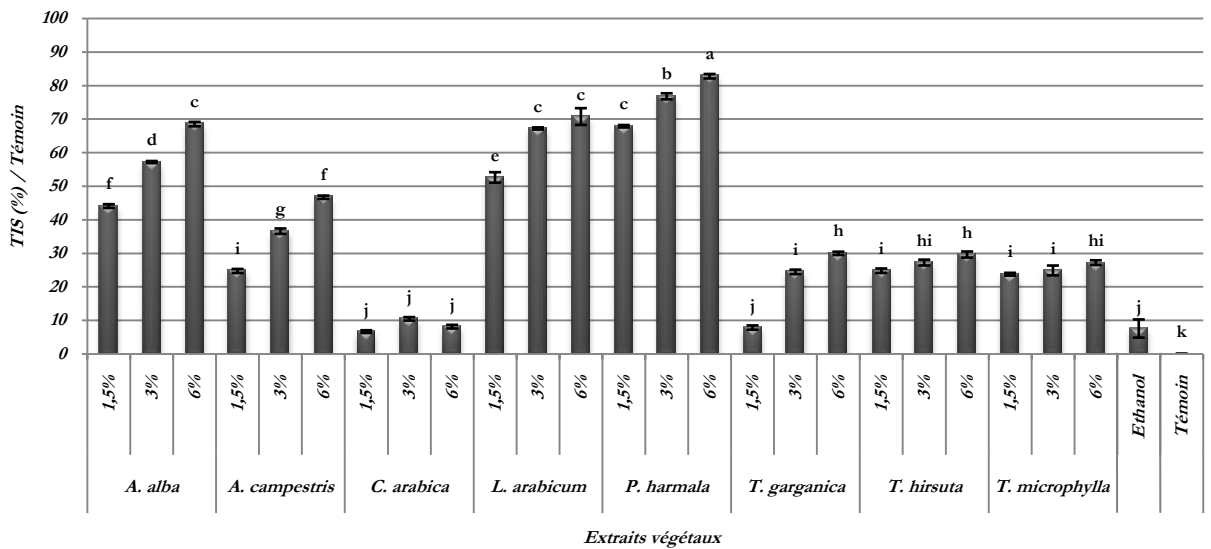
TIS : Taux d'inhibition de la sporulation / témoin, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour  $n = 5$ , Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

Figure 49 : Effet des extraits végétaux bruts sur la sporulation de *A. rabiei*.



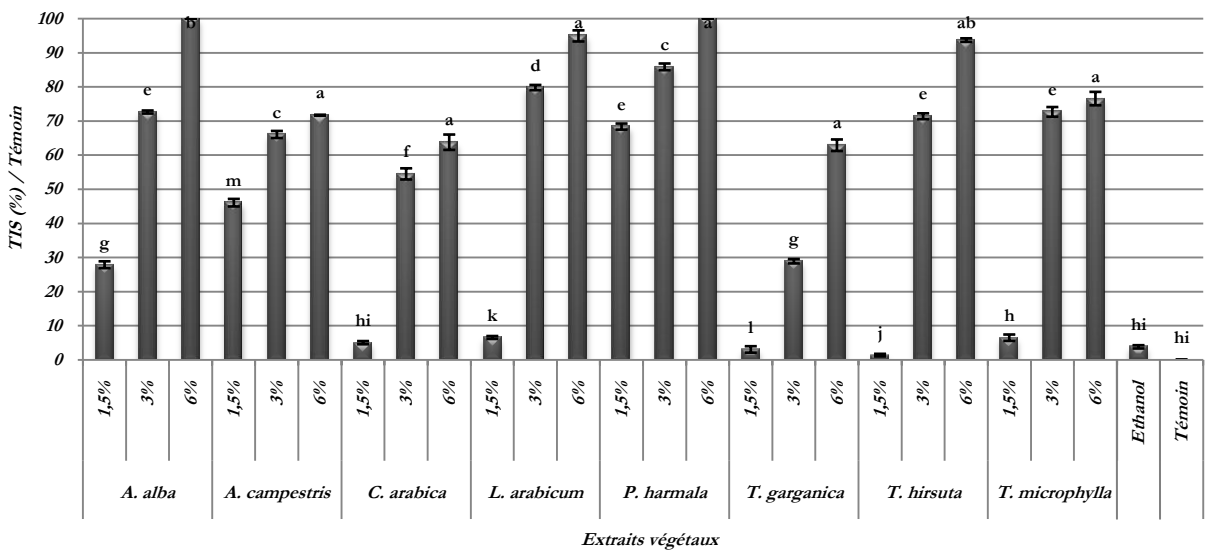
TIS : Taux d'inhibition de la sporulation / témoin, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour  $n = 5$ , Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

Figure 50 : Effet des extraits végétaux bruts sur la sporulation de *A. pinodes*.



TIS : Taux d'inhibition de la sporulation / témoin, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour n = 5, Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

Figure 51 : Effet des extraits végétaux bruts sur la sporulation de *P. medicaginis var. pinodella*.



TIS : Taux d'inhibition de la sporulation / témoin, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour n = 5, Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

Figure 52 : Effet des extraits végétaux bruts sur la sporulation de *A. pisi*.

Globalement, l'évaluation des effets des différents extraits sur la sporulation révèle que c'est les extraits de *P. harmala*, de *A. alba* et de *L. arabicum* qui ont limité le plus le pouvoir sporulant des champignons. En plus de ces trois extraits qui avaient également des effets notables sur la croissance mycélienne, il y a lieu de signaler celui de *A. campestris* qui enregistre aussi des effets inhibiteurs importants de la sporulation de l'ensemble des espèces fongiques.

Par espèces, *A. pisi* s'est également distingué quant à l'effet des différents traitements sur sa sporulation. En plus des quatre extraits qui se montrent efficaces en inhibant la sporulation de tous les champignons, les extraits de *T. hirsuta*, de *T. microphylla*,

de *C. arabica* et de *T. garganica* ont fortement réduit le nombre de pycniospores produites par *A. pisi*. Les taux de réduction enregistrés dans ce sens sont légèrement au dessus de 90% dans le cas de l'extrait de *T. hirsuta* à 6% contre 76, 63 et 62% enregistrés respectivement avec les trois autres extraits à la même dose. A 3% de ces extraits, les taux variaient entre 29% pour *T. garganica* et 72% pour *T. microphylla*.

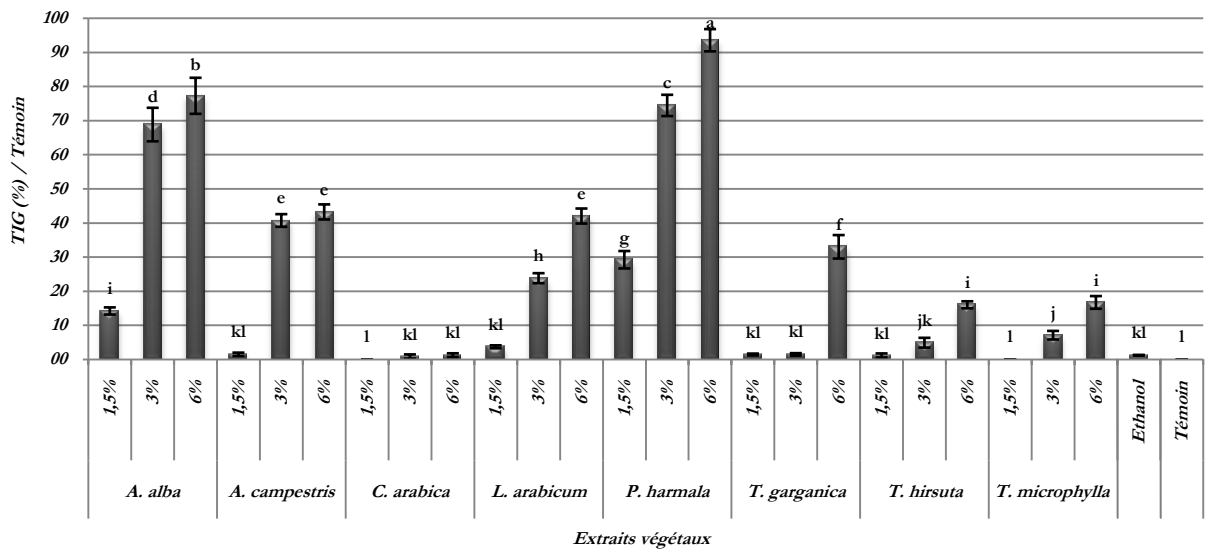
Au sujet des autres espèces fongiques, l'allure ou la tendance générale des taux d'inhibition de leur sporulation est fortement identique à celle notée dans le cas des taux d'inhibition de leur croissance mycélienne. A cet égard, les taux les plus importants sont ceux dus à l'effet des extraits de *P. harmala*, de *A. alba* et de *L. arabicum* où *P. medicaginis* var. *pinodella* trouve sa sporulation complètement inhibée avec 6% d'extrait de *P. harmala* ou de *A. alba* alors que, l'extrait de *L. arabicum* à la même dose, a pu la diminuer d'un taux avoisinant les 70%.

S'agissant de *A. rabiei* et de *A. pinodes*, les taux d'inhibition de leur sporulation suite à un traitement à l'extrait de *P. harmala* à 6%, sont respectivement de l'ordre de 92 et 82% en moyenne contre 76 et 73% respectivement lorsqu'ils sont confrontés à un traitement pareil avec l'extrait de *L. arabicum*. De telles constatations sont également valables quant à l'application de ces trois extraits aux doses de 1,5 et 3%. Les taux d'inhibition de la sporulation des trois champignons varient entre 40% à une dose de 1,5% et 57 à 71% pour une dose de 3% d'extrait dans le milieu.

Contrairement à son effet sur la croissance mycélienne de *A. rabiei*, *A. pinodes* et *P. medicaginis* var. *pinodella* qui s'est montré relativement faible, l'extrait de *A. campestris* à une dose de 6%, s'avère très efficace comme inhibiteur de la sporulation en réduisant le nombre de pycniospores des trois pathogènes de plus de 48% en moyenne et il en est de même dans le cas des doses plus faibles, à savoir 1,5 et 3%.

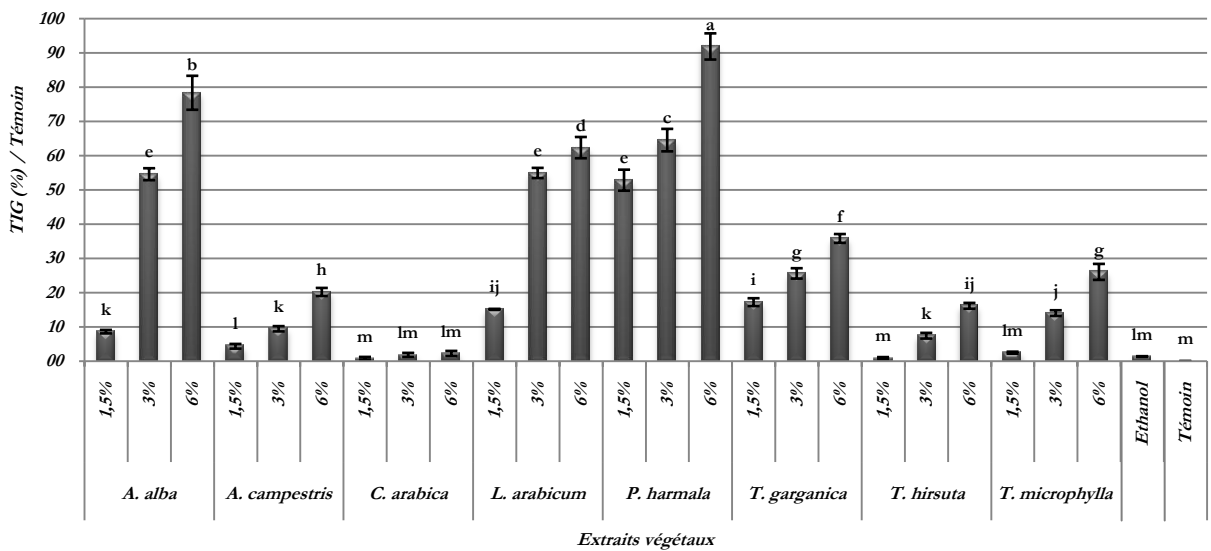
### ***II-1-1-3. Effet des extraits végétaux bruts sur la germination***

Parallèlement à l'évaluation de l'effet des extraits végétaux bruts des huit espèces végétales sur la croissance et la sporulation de *A. rabiei*, *A. pinodes*, *P. medicaginis* var. *pinodella* et *A. pisi*, l'effet sur le pouvoir germinatif de leurs pycnidiospores est également évalué à travers le taux d'inhibition de la germination (TIG) comparativement à des témoins ne subissant pas de traitements aux extraits. Les résultats relatifs à cette évaluation sont représentés dans les figures ci-après.



TIG : Taux d'inhibition de la germination / témoin, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour n = 5, Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

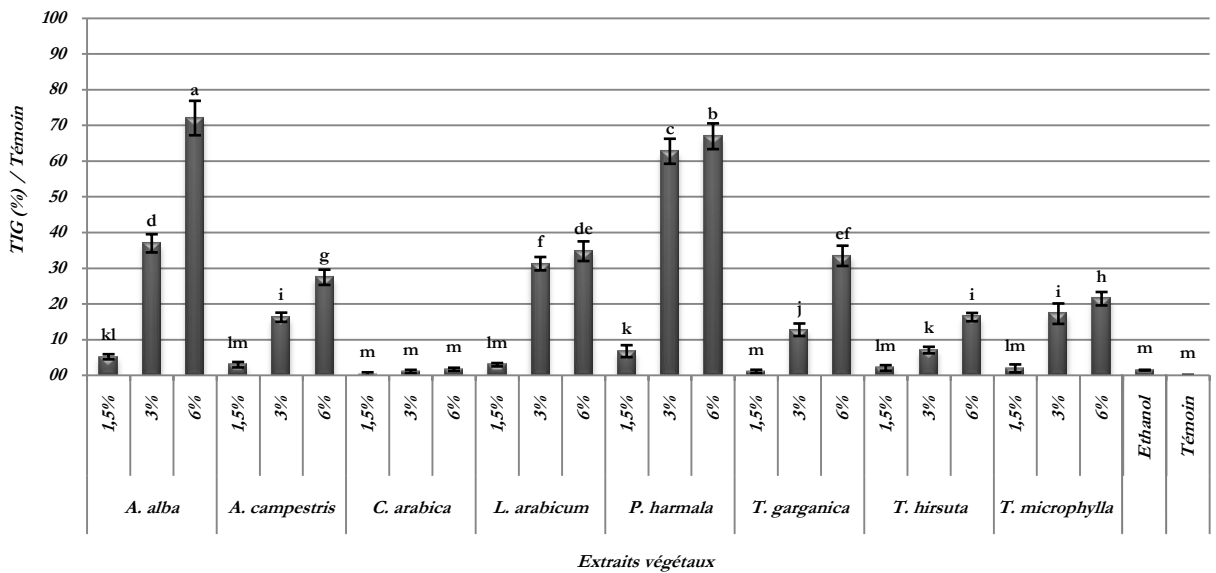
**Figure 53 :** Effet des extraits végétaux bruts sur la germination des conidies de *A. rabiei*.



TIG : Taux d'inhibition de la germination / témoin, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour n = 5, Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

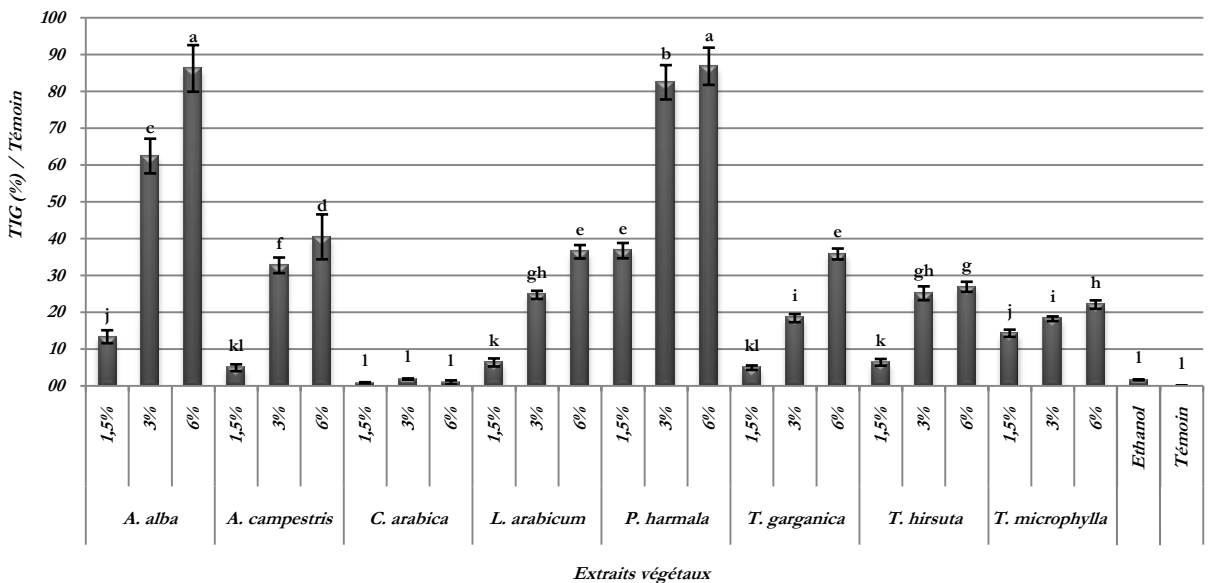
**Figure 54 :** Effet des extraits végétaux bruts sur la germination des conidies de *A. pinodes*.

Des figures 53, 54, 55 et 56, il ressort que les huit extraits végétaux testés *in-vitro* comme traitement antigerminatif des pycniospores des quatre agents phytopathogènes, objet des bioessais, agissent différemment et laissent apparaître des effets statistiquement significatifs des facteurs étudiés ( $P < 0,01$ ). Ces facteurs laissent apparaître des moyennes de traitement avec des différences également significatives. En outre, il y a lieu de noter que pour l'ensemble des extraits, le niveau d'inhibition de la germination des conidies est fortement lié à la dose de l'extrait. Les effets inhibiteurs les plus importants correspondent à la dose d'extrait la plus élevée (6%) alors que, les plus bas le sont à 1,5% d'extrait dans le milieu.



TIG : Taux d'inhibition de la germination / témoin, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour n = 5, Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

**Figure 55 :** Effet des extraits végétaux bruts sur la germination des conidies de *P. medicaginis var. pinodella*.



TIG : Taux d'inhibition de la germination / témoin, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour n = 5, Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

**Figure 56 :** Effet des extraits végétaux bruts sur la germination des conidies de *A. pisi*.

Les résultats de l'évaluation des taux d'inhibition de la germination des conidies confirment d'avantage les effets inhibiteurs des extraits de *P. harmala*, de *A. alba* et de *L. arabicum*, exercés sur la croissance et la sporulation en enregistrant aussi des effets antigerminatifs très appréciables à l'égard des conidies appartenant aux quatre champignons. Dans ce sens, les taux d'inhibition de la germination les plus élevés sont ceux issus des traitements à 6% d'extrait de *P. harmala* suivis de ceux de *A. alba* et *L. arabicum*, appliqués à la même dose sur les pycniospores de *A. rabiei* et *A. pinodes*. En revanche, les pycniospores de *P. medicaginis var. pinodella* semblent être plus sensibles à 6%

d'extrait de *A. alba* que de celui de *P. harmala* en affichant respectivement des taux de 72 et 67%. Concernant *A. pisi*, l'action des deux extraits sur le taux de germination de ses conidies s'est montré sensiblement la même.

En plus des extraits de *P. harmala*, de *A. alba* et de *L. arabicum*, le reste des extraits, particulièrement ceux de *A. campestris* et de *T. garganica*, ont aussi influencé le pouvoir germinatif des conidies en montrant des taux d'inhibition de germination relativement appréciables. En effet, l'extrait de *A. campestris* à 6% a pu inhiber la germination des conidies de *A. rabiei* et de *A. pisi* d'un taux dépassant les 40% en moyenne tandis que les taux enregistrés dans le cas de *A. pinodes* et de *P. medicaginis var. pinodella* n'atteignaient qu'une moyenne de 23%. Par ailleurs, Les taux observés avec l'extrait de *T. garganica* à la même dose oscillaient entre 32 et 35% pour l'ensemble des espèces fongiques.

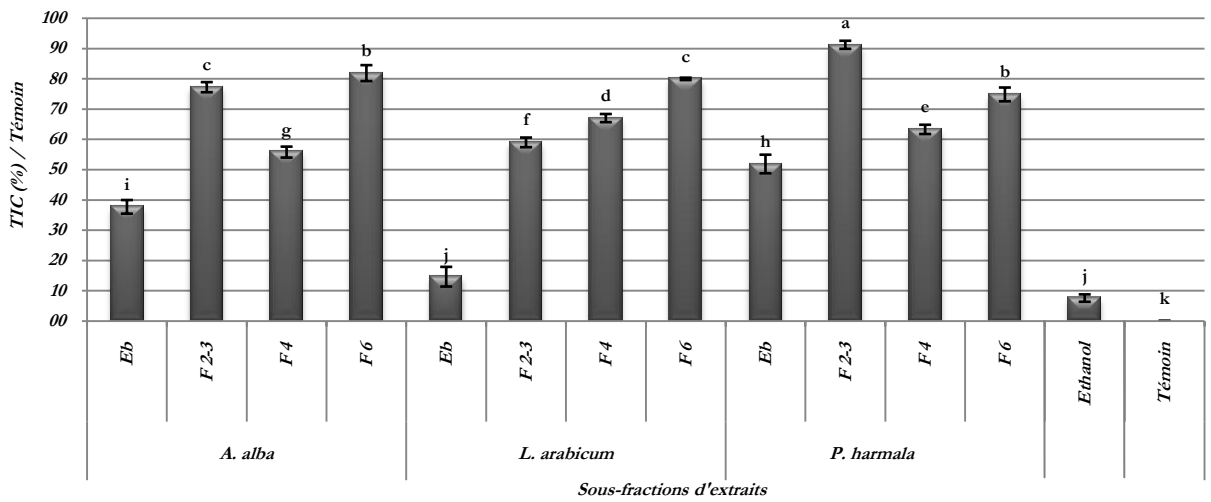
## **II-1-2. Bioessais aux sous-fractions d'extraits**

À l'issue des tests aux extraits végétaux bruts, les extraits de *A. alba*, de *L. arabicum* et de *P. harmala*, jugés comme intéressants en matière de leur action inhibitrice de quelques paramètres biologiques des quatre agents phytopathogènes, ont subi un fractionnement afin de séparer et d'isoler les principaux groupes de phytoconstituants, connus pour être bioactifs et susceptibles d'avoir joué un rôle dans la bioactivité des extraits bruts.

Identiquement aux extraits bruts, des bioessais aux sous-fractions F2-3 (alcaloïdes), F4 (terpènes et stérols) et F6 (substances acides, phénols et flavonoïdes), issues des extraits des trois plantes, ont été réalisés afin de tester leurs effets sur la croissance, la sporulation et la germination des pycniospores de *A. rabiei*, et *A. pinodes*.

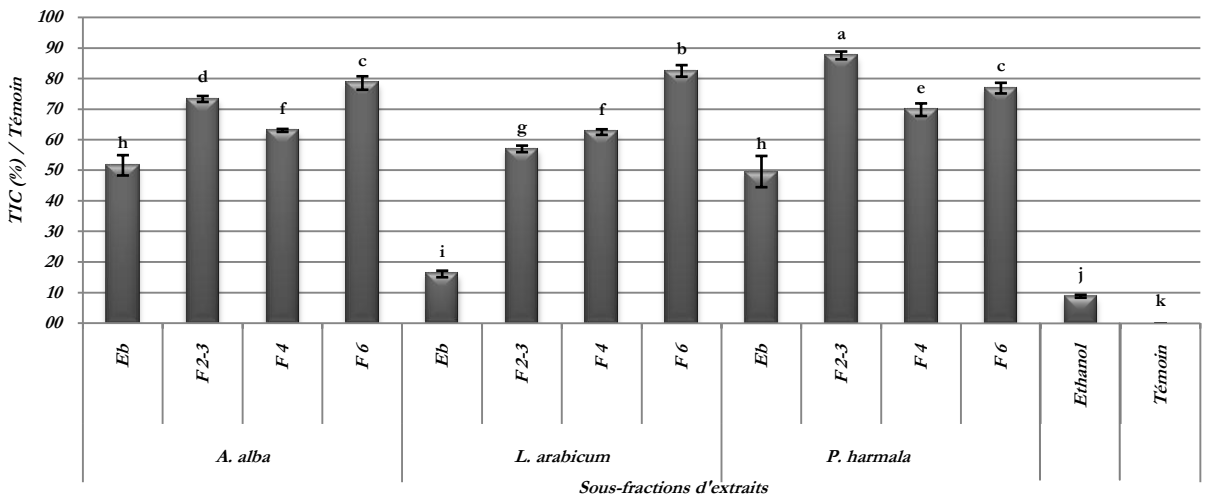
### **II-1-2-1. Effet des sous-fractions d'extraits sur la croissance mycélienne**

L'évaluation de la croissance mycélienne de *A. rabiei* et de *A. pinodes*, suite à l'introduction séparée des sous-fractions F2-3, F4 et F6, issues des extraits de *A. alba*, de *L. arabicum* et de *P. harmala*, à une dose de 3% dans leur milieu de culture et la comparaison de cette évaluation à la croissance des cultures témoins dont le milieu est exempt de sous-fractions d'extraits, nous ont permis de déterminer les taux d'inhibition de la croissance (TIC) des deux champignons, ces taux sont représentés ci-dessous dans les figures 57 et 58.



TIC : Taux d'inhibition de la croissance / témoin, Eb : Extrait brut, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour n = 5, Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

**Figure 57 :** Effet des sous-fractions d'extraits végétaux sur la croissance mycélienne de *A. rabiei*.



TIC : Taux d'inhibition de la croissance / témoin, Eb : Extrait brut, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour n = 5, Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

**Figure 58 :** Effet des sous-fractions d'extraits végétaux sur la croissance mycélienne de *A. pinodes*.

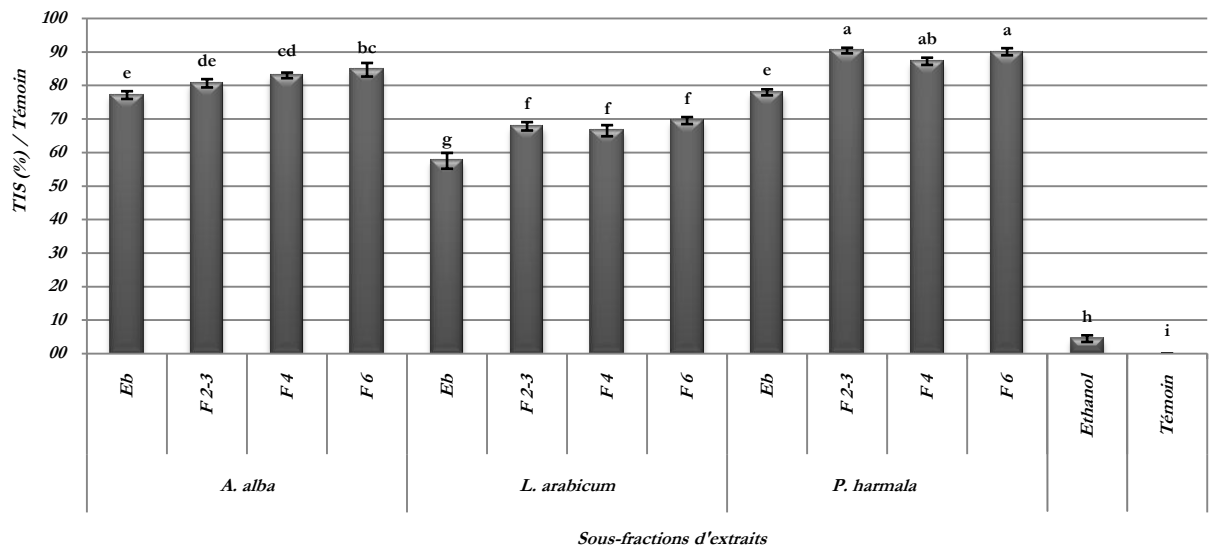
L'analyse statistique des résultats relatifs à l'action des différentes sous-fractions sur la croissance mycélienne de *A. rabiei* et *A. pinodes* a montré des effets très significatifs ( $P < 0,01$ ) suivant la variation de la nature et de l'origine de la sous-fraction, de l'espèce fongique ainsi que de l'interaction entre ces deux facteurs. Globalement, l'ensemble des sous-fractions affichent des taux beaucoup plus importants que ceux enregistrés avec les extraits bruts.

Selon le type et l'origine de la sous-fraction, il semble que dans le cas des deux agents phytopathogènes, la sous-fraction F2-3 inhibe plus leur croissance quand elle provient de l'extrait de *P. harmala* que si elle l'est de *A. alba* ou de *L. arabicum*. En revanche, les sous-fractions F6 issues de ces dernières plantes, ont montré des taux d'inhibition de la croissance des deux espèces fongiques supérieurs à ceux de la F6

d'origine *P. harmala*. Concernant la F4, il semblerait que son action est plus marquée sur la croissance de *A. rabiei* que sur celle de *A. pinodes* lorsqu'elle est d'origine *L. arabicum*, par contre, cette action se trouve plus accentuée sur *A. pinodes* dans le cas où cette sous-fraction est extraite de *A. alba* ou de *P. harmala*.

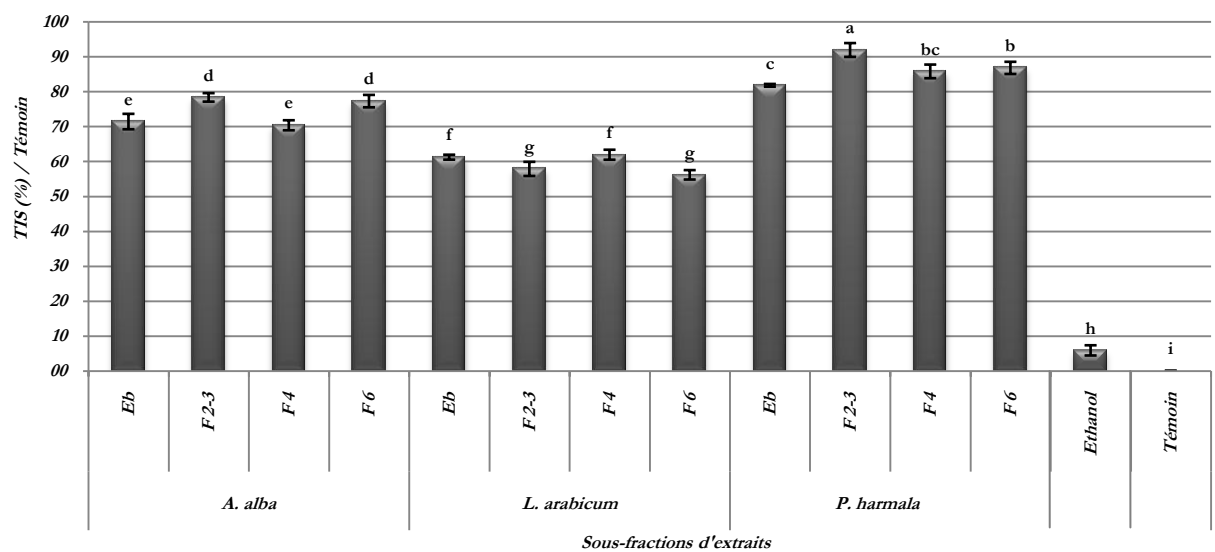
**II-1-2-2. Effet des sous-fractions d'extraits sur la sporulation**

Les effets des sous-fractions d'extraits végétaux sur la sporulation de *A. rabiei* et *A. pinodes*, exprimés au taux d'inhibition de la sporulation (TIS) comparativement à la sporulation des témoins respectifs, sont illustrés dans les figures 59 et 60.



TIS : Taux d'inhibition de la sporulation / témoin, Eb : Extrait brut, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour n = 5, Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

**Figure 59 :** Effet des sous-fractions d'extraits végétaux sur la sporulation de *A. rabiei*.



TIS : Taux d'inhibition de la sporulation / témoin, Eb : Extrait brut, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour n = 5, Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

**Figure 60 :** Effet des sous-fractions d'extraits végétaux sur la sporulation de *A. pinodes*.

De ces deux figures, on constate que les niveaux d'inhibition de la sporulation des deux pathogènes varient suivant l'origine de la sous-fraction dans la mesure où la sporulation de chacune des deux espèces fongiques est différemment influencée par des sous-fractions de même nature mais d'origines botaniques différentes. A cet effet, la comparaison statistique des actions des différents facteurs sur la sporulation laisse noter des différences significatives ( $P < 0,01$ ).

Suivant l'origine, c'est les sous-fractions issues de l'extrait brut de *P. harmala* qui réduisent le plus la capacité des deux champignons à sporuler. Dans ce sens, la sporulation de *A. pinodes* est réduite de plus de 90% dans le cas d'un traitement à la F2-3 contre un peu plus de 85% dans le cas d'un traitement à la F4 ou à la F6. Avec *A. rabiei*, c'est la F2-3 et la F6 qui réduisent d'une manière importante les niveaux de sporulation en atteignant le taux de 90%.

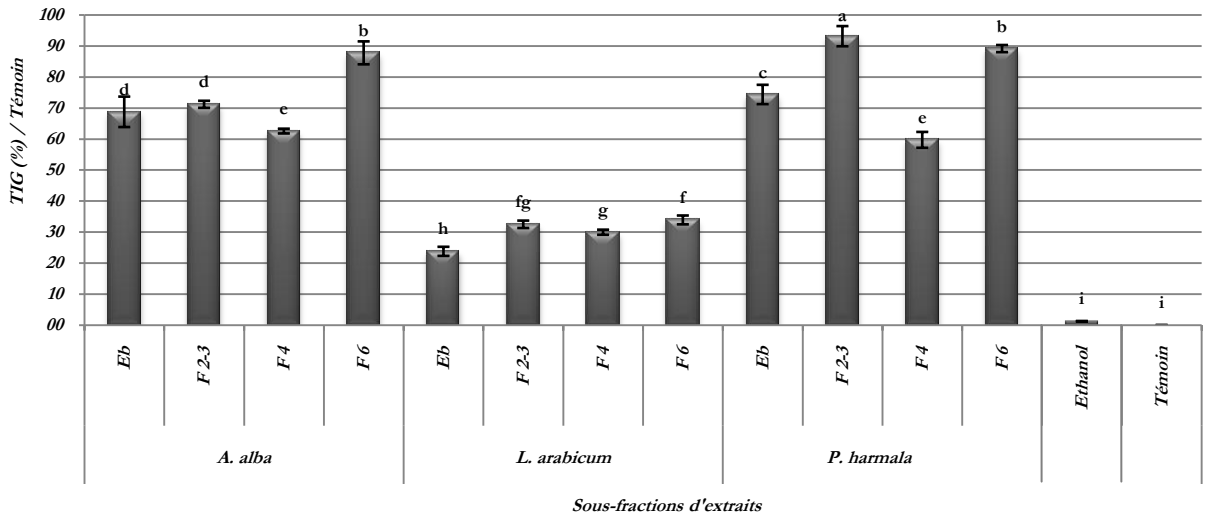
En ce qui concerne les sous-fractions de *A. alba*, les taux d'inhibition de la sporulation succèdent directement ceux enregistrés avec les sous-fractions de *P. harmala*. Les meilleurs taux avoisinent les 85% si *A. rabiei* est traité à la F6, contre 81% en moyenne dans le cas d'un traitement du même champignon à la F2-3 ou à la F4. Lorsqu'il s'agit de *A. pinodes*, les taux sont sensiblement inférieurs comparativement à ceux notés dans le cas de *A. rabiei* en s'affichant à des niveaux d'inhibition en dessous des 80% avec plus d'efficacité de la F2-3 et de la F6. S'agissant des sous-fractions de l'extrait de *L. arabicum*, les taux d'inhibition de la sporulation enregistrés laissent distinguer que d'une part, les sous-fractions de l'extrait de cette plante inhibent moins la sporulation des deux champignons comparativement aux sous-fractions de *A. alba* et de *P. harmala*. D'autre part, *A. rabiei* s'est montré plus sensible à ces sous-fractions que *A. pinodes*. A ce sujet, les taux moyens, toute sous-fraction confondue, avoisinent respectivement les 68 et 58%.

### **II-1-2-3. Effet des sous-fractions d'extraits sur la germination**

Les résultats qui concernent l'étude de l'effet des sous fractions d'extraits végétaux de *A. alba*, de *P. harmala* et de *L. arabicum* sur le pouvoir germinatif des pycnidiospores de *A. rabiei* et de *A. pinodes*, sont rapportés par les figures 61 et 62. L'effet antigerminal des sous-fractions est exprimé au taux d'inhibition de la germination (TIG) par comparaison à des traitements témoins.

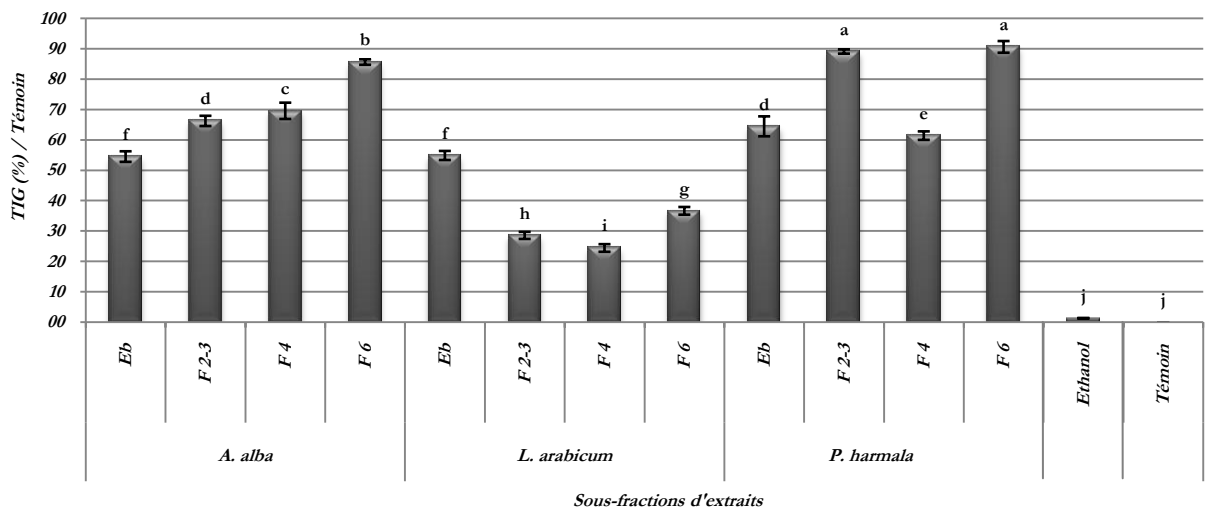
Le traitement statistique de ces résultats révèle qu'ils sont très influencés par le facteur type de la sous-fraction qui enregistre un effet hautement significatif ( $P < 0,01$ ) et qui laisse découler ainsi des moyennes avec des écarts également significatifs, en

revanche l'effet du facteur espèce fongique s'est révélé non significatif ( $P > 0,05$ ), les moyennes enregistrées dans ce sens (*A. rabiei* = 52,016, *A. pinodes* = 52,011) appartiennent à un seul groupe. Par conséquent, il apparaît clairement qu'en matière de germination des conidies, les deux champignons se sont comportés d'une manière presque semblable.



TIG : Taux d'inhibition de la germination / témoin, Eb : Extrait brut, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour  $n = 5$ , Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

**Figure 61 :** Effet des sous-fractions d'extraits végétaux sur la germination des conidies de *A. rabiei*.



TIG : Taux d'inhibition de la germination / témoin, Eb : Extrait brut, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour  $n = 5$ , Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

**Figure 62 :** Effet des sous-fractions d'extraits végétaux sur la germination des conidies de *A. pinodes*.

Concernant l'effet des différentes sous-fractions, c'est avec celles de l'extrait de *P. harmala* que les taux d'inhibition de germination des pycniospores sont les plus importants, suivis dans l'ordre par ceux exercés par les sous-fractions de *A. alba* et de *L. arabicum*. Quelque soit l'appartenance des conidies, leur germination est influencée le plus par les sous-fractions F2-3 et F6 de *P. harmala* avec des taux d'inhibition moyens de 91 et 89% respectivement contre 60% avec la F4 du même extrait.

Quant aux sous-fractions de l'extrait de *A. alba*, c'est la F6 qui prédomine en réduisant le nombre de conidies germées d'un taux moyen frôlant les 87% contre 68 et 66% dans le cas de la F2-3 et la F4 respectivement. Par ailleurs, les taux d'inhibition de la germination des conidies les plus faibles sont enregistrés avec les sous-fractions de *L. arabicum*, toutes sous-fractions confondues.

## II-2. Discussion

La croissance et le développement d'un champignon sont très dépendants des conditions trophiques et environnementaux. La présence dans leur milieu de substances antibiotiques à leur égard, peut perturber leur cycle de développement normal. Comme pathogène de plantes, la capacité d'un champignon à croître et à se reproduire est une des principales composantes de son pouvoir pathogène. A cet effet, beaucoup de méthodes de lutte contre les maladies cryptogamiques de plantes visent à perturber ou bloquer le cycle de développement des agents causals de maladies. La recherche de nouvelles techniques et de nouvelles stratégies de gestion des maladies des plantes a conduit à la mise au point d'études sur les antagonistes des agents phytopathogènes (Johnson & Dileone, 1999 ; Bashan & De-Bashan, 2002 ; Aysan & al., 2003). Une attention croissante et particulière est accordée dans ce sens aux substances d'origine botaniques, en raison de leur bioactivité avérée contre un très grand nombre de champignons pathogènes de plantes (O'Callaghan & al., 2000 ; Buskov & al., 2002).

La plupart des travaux s'intéressant à l'activité antifongique des substances végétales, passent inéluctablement par des études *in-vitro* des effets de ce genre de substances sur la croissance et le développement des champignons phytopathogènes avant d'accomplir des tests *in-planta* (Pandey & al., 2002 ; Aires & al., 2009 ; Sales & al., 2016). C'est dans ce sens que nous avons réalisé des bioessais de screening *in-vitro* d'extraits végétaux de *A. alba*, *A. campestris*, *C. arabica*, *L. arabicum*, *P. harmala*, *T. garganica*, *T. hirsuta* et *T. microphylla* en testant leurs effets sur la croissance, la sporulation et la germination des pycnidiospores de *A. rabiei*, de *A. pinodes*, de *P. medicaginis* var. *pinodella* et de *A. pisi*.

Des résultats obtenus, on constate que, d'une part, les extraits bruts issus des huit plantes suscitées, ont agi différemment sur les paramètres biologiques mesurés suivant la plante fournissant l'extrait ainsi que suivant la dose de ce dernier. D'autre part, c'est surtout à partir de *A. alba*, de *P. harmala* et de *L. arabicum* que proviennent les extraits qui ont manifesté des actions inhibitrices plus remarquables sur la croissance, la

sporulation et la germination des conidies des champignons étudiés. A notre sens, la diversité des espèces végétales, qui appartiennent à des familles botaniques différentes, pourrait expliquer les différences enregistrées dans leur action sur les trois paramètres mesurés. En outre, des extraits issus de plantes différentes auraient vraisemblablement des profils phytochimiques différents, en particulier sur le plan de structure, de composition et de contenance en substances bioactives. Par ailleurs, l'addition d'extrait au milieu de culture du champignon à différentes doses se répercuterait directement sur la concentration de ces substances dans le milieu, concentration à laquelle nous pourrions imputer les différences notées, d'une dose à une autre au sein du même extrait, en matière de niveaux d'actions inhibitrices.

Şesan et al. (2015), dans des travaux de screening d'extraits végétaux obtenus de *Achillea millefolium* L., *Allium sativum* L., *Artemisia dracunculus* L., *Hysopus officinalis* L., *Mentha* sp., *Rosmarinus officinalis* L., *Satureja hortensis* L., *Tagetes patula* L., *Valeriana officinalis* L., testés contre *Botrytis cinerea* Pers., agent de la pourriture grise de plusieurs plantes cultivées, décrivent des activités antifongiques très variables suivant la plante d'où provient l'extrait. A cet effet, les auteurs avancent plusieurs raisons quant à cette variabilité, en mettant l'accent surtout sur l'origine botanique de l'extrait ainsi que sa dose dans le milieu, du moment qu'ils influencent fortement la composition chimique des extraits.

Dans une étude similaire, Masangwa et al. (2013), enregistrent des comportements très différents de *Colletotrichum lindemuthianum* et *Colletotrichum dematium*, respectivement agents causals de l'anthracnose de l'haricot et du niébé, lorsqu'ils sont cultivés sur des milieux contenant séparément des extraits végétaux de *Ipomoea batatas*, *Carica papaya*, *Allium sativum*, *Syzygium cordatum*, *Chlorophytum comosum* et *Agapanthus canlescens*. Outre l'origine de l'extrait, les auteurs attribuent les différences dans l'efficacité des extraits au type de l'extrait suivant le solvant et le procédé d'extraction dans la mesure qu'ils utilisaient plusieurs solvants et procédés dans l'obtention des extraits, alors que les comportements distincts des deux champignons à l'égard du même extrait, les attribuent à l'effet espèce de l'agent phytopathogène lui-même. Eksteen et al. (2001), dans des travaux consacrés à l'étude du comportement *in-vitro* de *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Botryosphaeria dothidea* et *Pythium ultimum* suite à l'introduction séparée dans leur milieu de culture d'une douzaine d'extraits végétaux, rapportent des réponses très variées selon l'espèce fongique et qu'ils l'imputent également à la variabilité entre les genres étudiés, une variabilité qui peut être même interspécifique.

La variabilité interspécifique est une explication qui peut être avancée afin d'interpréter le comportement très différent vis-à-vis des extraits, voire du même extrait, de *A. pisi* comparativement à *A. rabiei*, *A. pinodes* et *P. medicaginis* var. *pinodella*, sachant que le comportement de ces trois dernières espèces, a pris une tendance générale très semblable. Beaucoup de spécialistes considèrent ces espèces comme très apparentées (Peever, 2007 ; Chen & al., 2017) en revanche, sur le plan phylogénique, *A. pisi* est plus proche à *Ascochyta fabae* et *Ascochyta lentis* (Peever & al., 2007 ; Ozkilinc al., 2015).

Le fractionnement des extraits végétaux bruts de *A. alba*, de *P. harmala* et de *L. arabicum* et l'étude de l'activité antifongique de leurs sous-fractions à l'égard de *A. rabiei* et *A. pinodes*, nous ont permis de confirmer davantage l'efficacité de ces extraits comme inhibiteurs de la croissance et du développement des champignons étudiés. Ce bioessai nous a permis aussi de mettre en évidence une action antifongique plus importante lorsqu'il s'agit de tester seul chaque groupe de phytoconstitués constituant l'extrait. Excepté *L. arabicum* dont l'extrait brut est particulièrement plus efficace que ses trois sous-fractions à la dose utilisée, les alcaloïdes (F2-3), les terpènes et stérols (F4) et les substances acides et composés phénoliques (F6), issus des extraits de *A. alba* et de *P. harmala*, ont exprimé mieux leur activité que les extraits sous leur forme brute. La coexistence de composés de différentes natures peut donner lieu à des interactions chimiques susceptibles de diminuer leur bioactivité (Walsh, 2003 ; Jeyaseelan & al., 2011 ; Scherf, 2011 ; Iqbal & al., 2015).

Par ailleurs, les résultats du bioessai aux sous-fractions nous laissent supposer que l'activité antifongique de l'extrait de *P. harmala* exercée sur les deux agents pathogènes pourrait être attribuée en premier lieu aux alcaloïdes de cette plante alors que, celles de *A. alba* et de *L. arabicum* seraient beaucoup plus liées aux substances acides et composés phénoliques dont les flavonoïdes. Les alcaloïdes et les composés phénoliques, les flavonoïdes en particulier, sont largement reconnus en matière d'activité antifongique. Beaucoup de travaux confirment cette activité à l'égard des bactéries et des champignons phytopathogènes (Lee & al., 2004 ; Svetaz & al., 2004 ; Dzoyem & Kuete, 2013).

### II-3. Publication

Préalablement aux bioessais *in-vitro* que nous venons de discuter les résultats, un autre bioessai a été réalisé en étudiant l'effet *in-vitro* des extraits végétaux bruts des mêmes plantes et l'effet de quelques sous-fractions d'extraits de *A. alba* et de *L. arabicum*, sur la croissance et la sporulation de *A. pisi*. Ce travail a fait l'objet de la publication ci-après.

## ***In vitro* effect of crude extracts from eight Algerian steppe plants on mycelial growth and sporulation of *Ascochyta pisi* Lib.**

Ammar Tiaiba<sup>1,3</sup>, Malika Derbali<sup>2</sup> & Boubekeur Seddik Bendahmane<sup>3,4</sup>

1 Department of Agricultural Sciences, Faculty of Sciences, University of M'Sila, BP 166 Echbilia, 28000 M'Sila, Algeria.

2 Department of Natural and Life Sciences, Faculty of Sciences, University of M'Sila, BP 166 Echbilia, 28000 M'Sila, Algeria.

3 Department of Agronomy, University of Mostaganem, Mostaganem, Algeria.

4 Plant Protection Laboratory, University of Mostaganem, Mostaganem, Algeria.

### **Resumen**

*Efecto in vitro sobre el crecimiento micelial y la esporulación de Ascochyta pisi Lib. de extractos crudos ocho plantas esteparias de Argelia*

Se ha estudiado el efecto de extractos crudos de ocho plantas, que crecen en la estepa argelina, contra *Ascochyta pisi* Lib., uno de los miembros del complejo *Ascochyta* que causa la antracnosis del guisante, con el objetivo de sustituirlos por fungicidas químicos con reconocida nocividad para el medio ambiente y la salud pública. Con este propósito, se realizó una prueba de control biológico *in vitro* del crecimiento y la esporulación de *A. pisi*, agregando extractos de plantas crudas o sus sub-fracciones a su medio de cultivo. Al final de este ensayo, encontramos que los extractos de *Artemisia alba* Turra, *Lycium arabicum* Schweinf. Ex Boiss. y *Peganum harmala* Linn. registraron las mejores tasas de inhibición del crecimiento de patógenos, mientras que *Artemisia campestris* L. es más efectiva contra su esporulación.

**Palabras clave:** Antracnosis, Guisante, Inhibición de crecimiento, Esporulación, Plantas esteparias, Extracto crudo

### **Abstract**

This work consists of studying the effect of crude extracts of eight plants growing in the Algerian steppe against *Ascochyta pisi* Lib., one of the members of the *Ascochyta* complex causing the *Ascochyta* blight of pea, with the aim of substituting them for chemical fungicides recognized for their harmfulness to the environment and public health. For this purpose, an *in-vitro* biocontrol test of the growth and sporulation of *A. pisi* was achieved by adding to its cultural medium a crude plant extracts or their sub-fractions. At the end of this trial, we found that the extracts of *Artemisia alba* Turra, *Lycium arabicum* Schweinf. Ex Boiss. and *Peganum harmala* Linn. recorded the best growth inhibition rates of pathogenic whereas, *Artemisia campestris* L. is more effective against its sporulation.

**Key words:** *Ascochyta* blight, Pea, Growth inhibition, Sporulation, Steppe plants, Crude extract.

### **Correspondence**

A. Tiaiba

E-mail: [ammar.tiaiba@univ-msila.dz](mailto:ammar.tiaiba@univ-msila.dz)

**Received:** 27 June 2018

**Accepted:** 21 September 2018

**Published on-line:** 30 November 2018

## Introduction

Ascochyta blight is the most important and most devastating disease effecting pea (*Pisum sativum* L.). It is caused by a group of fungi belonging to the genus *Ascochyta* Lib., known as the Ascochyta complex and including *Ascochyta pisi* Lib., *Mycosphaerella pinodes* (anamorphic syn. *Ascochyta pinodes* L. K. Jones) Boerema) and *Didymella pinodella* (L.K. Jones) Q. Chen & L. Cai (anam. syn. *Ascochyta pinodella* L. K. Jones) (= *Phoma medicaginis* var. *pinodella* (L.K. Jones) (Schoeny *et al.* 2007, Tivoli & Bannisa 2007). In recent years, in Australian literature has cited *Phoma koolunga* Davidson, Hartley, Priest, Krysinska-Kaczmarek, Herdina, McKay & Scott as a pathogen causing, alone or in association with the other three species, Ascochyta blight on pea (Davidson *et al.* 2009, Tran & You 2014, Ahmed *et al.* 2015, Barilli *et al.* 2016). In Algeria, and despite the presence of the three species of *Ascochyta* causing Ascochyta blight, *A. pisi* predominates in addition to the other two species (Tadja *et al.* 2009.). The disease affects peas all over the world, including Algeria, where it causes important losses. The lack of effective control measures and the severity of attacks can sometimes lead to the total destruction of crops (Fondevilla *et al.* 2007). The most commonly used control methods focus mainly on the use of chemical pesticides (Onfroy *et al.* 2007), except seed treatments, these products are not very effective in addition to their harmful effects on the environment and the health of the consumer.

Fungal diseases in plants can be controlled by using fungicides. Use of fungicides may have adverse effects including toxicity to humans and organisms in the environment. Alternatively, biological control using natural substances may be used against plant pathogens (Mahlo *et al.* 2010). The search for alternative solutions to the usual chemical control methods is more than necessary. Multiple studies on biopesticides show that some plant-derived products can be a cure for conventional plant protection problems by being effective in controlling plant pathogens (El Guilli *et al.* 2009).

We have conducted this work which aims to study the effect of some crude extracts of plants from the Algerian steppe on the growth and sporulation of *A. pisi*, one of the three pathogens of Ascochyta blight of pea and we also want to a

contribution of valorization of plants which grow naturally in the steppe in the research and the development of new molecules of natural origin allowing us to reduce the use of the chemical products, whose problems with which there are bound are well established.

## Material and methods

### Plant Material

The plant material constituting the source of plant extracts is a set of eight plants collected in the natural El-Mergueb reserve located in the Hodna Steppe (Central Algeria). These eight species belonging to different families and selected according to their importance in pharmacopoeia and popular medicine as well as their abundance which has been visually estimated. These plant species are: *Artemisia alba* Turra., *Artemisia campestris* L., *Cleome arabica* L., *Lycium arabicum* Schweinf. Ex Boiss., *Peganum harmala* Linn., *Thapsia garganica* L., *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl., *Thymelaea microphylla* Coss & Dur.

The aerial parts of the steppe plants were collected in the spring of 2015 and kept in the shade to minimize photo-oxidation (Mahlo *et al.* 2010). According to Ogbebor *et al.* (2005), the plant material has undergone drying. Drying of the plants was done at room temperature (about 20-23 °C) for two weeks after being examined and the old and infected leaves were removed. Drying is stopped when the plants are sufficiently brittle. Once dried, the plant material is then ground into a very fine powder using a laboratory plant grinder. The vegetable powder obtained is stored in paper bags in the dark until extraction.

### Fungal material

The fungal material is the fungus *Ascochyta pisi*, causal agent of ascochyta blight of a pea. It is isolated from pea plant showing the symptoms of the disease. The cultures used in the bioassay come from pure and single-spore cultures to ensure maximum genetic uniformity (Bowen *et al.* 1997). CDA medium (Chickpea seed meal Dextrose Agar) was selected as a basic culture medium.

### Plant extracts and sub-fractions

The crude plant extracts were obtained in a Soxhlet type assembly (Pretorius *et al.* 2002) and whose solvent is absolute ethanol. Part of the

crude extracts (crude extracts will show high levels of inhibition of mycelial growth) are then fractionated separately by successive washing with HCl and NaOH solutions, Dichloromethane, Methanol and Hexane in according to a protocol described by William *et al.*, (2006). In our test, the fractionation only concerned with *L. arabicum* and *A. alba*. Once the different sub-fractions have been obtained, the solvents are then removed from the solutions of the sub-fractions by evaporation under reduced pressure using a rotary evaporator (ROTAVAPOR R-210 BUCHI). The dry extract resulting from evaporation is then dissolved in ethanol at a known concentration and stored at -18 °C. to use. The sub-fractions prepared for testing are detailed in Table 1.

### Antifungal activity

The bioassay consists of measuring the mycelial growth and sporulation of *A. pisi* on the CDA medium supplemented separately with plant extracts at 1.5, 3 and 6%. Mycelial growth and sporulation are also evaluated on the same medium supplemented with ethanol at a dose of 3% (solvent control) and on the same medium free of plant extract and ethanol (negative control). Mycelial discs of diameter 5mm taken are then deposited in the centre of each of Petri dish containing the medium with or without added plant extract. The incubation is carried out in the room temperature at 21 °C ± 0.1.

When the growth of the fungus in the Petri dishes of control treatment reaches the edges, the incubation is stopped and the mycelial growth and the number of spores per cm<sup>2</sup> with the MALASSEZ Hemocytometer, are then measured in order to evaluate the effect of the extracts on sporulation and calculate the growth inhibition (GI) rate of the different extracts according to the formula shown below (Dalili *et al.* 2015):

$$GI\% = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: The average mycelial growth in the control treatments.

B: The average mycelial growth in treatments with different plant extracts.

In the same way with the trial with crude plant extracts, another test is carried out by adding the sub-fractions of plant extracts of *L. arabicum* and *A. alba* following the same protocol and with the same measurements carried out previously.

| Sub-fraction extraction solvent | Name of sub-fraction |
|---------------------------------|----------------------|
| HCl and NaOH Solutions          | F2                   |
| Dichloromethane                 | F4                   |
| Methanol                        | F5                   |
| Hexane                          | F6                   |

**Tabla 1.** Descripción de las sub-fracciones utilizadas en el bioensayo.

**Table 1.** Description of the sub-fractions used in the bioassay.

### Data Analysis

All the results obtained have been statistically analyzed using SAS software (SAS System 9.4, SAS Institute Inc.). ANOVA tests are performed at the 0.05 and 0.01 levels.

### Results and discussion

The results clearly show that at the end of the incubation, the mycelial growth of *A. pisi* was totally inhibited compared to the negative control and the solvent control at 6% of all the plant extracts tested. Except for 6% of plant extract, the inhibition rate of growth is clearly proportional to the dose of extract where the growth is more inhibited at 3% than at 1.5% of the extract in the medium. However, at 3% of plant extract in the medium, the highest levels of inhibition were recorded with *L. arabicum*, *A. alba* and *P. harmala* extracts, note that in this case, the inhibition of mycelial growth is around 98%. On the other hand and at the same dose, the extracts from *A. campestris* and *T. microphylla* were less effective than the extracts cited above and recorded average rates which oscillate around 85% (Fig. 1).

Concerning sporulation, it is to be noted that when *A. pisi* is cultivated on a medium containing 6% of plant extract of any plant, does not sporulate contrary to the control and the cultures on medium containing 3% of ethanol. The lowest sporulation levels were recorded with extract at 3%, particularly with the crude extract of *A. campestris* when the medium contains 1.5% of plant extract, the fungus could sporulate at levels sometimes exceeding the controls (Fig. 2).

The result of the evaluation of the inhibition rates of the various crude plant extracts, it appeared to us that the level of 3% of crude extract in the medium of the fungus constitutes the lowest effective dose where, *L. arabicum* and *A. alba* were relatively effective and their crude extracts were then fractionated into four sub-fractions mentioned.

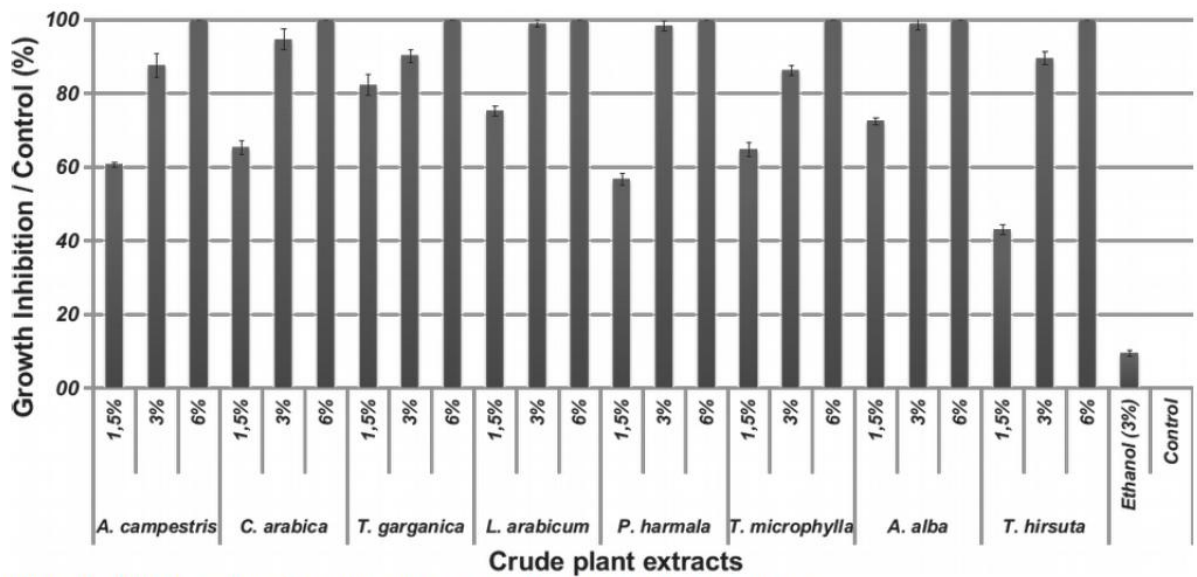


Figura 1. Efecto de los extractos de plantas crudas en el crecimiento micelial de *Ascochyta pisi*.

Figure 1. Effect of crude plant extracts on mycelial growth of *Ascochyta pisi*.

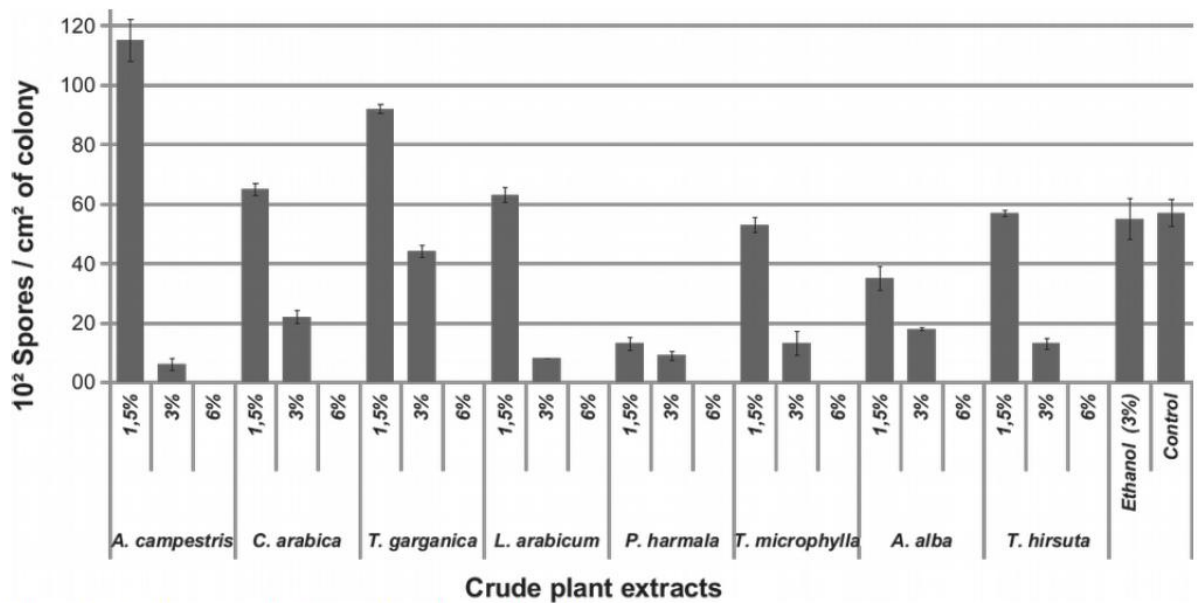


Figura 2. Efecto de extractos de plantas crudas en la esporulación de *Ascochyta pisi*.

Figure 2. Effect of crude plant extracts on sporulation of *Ascochyta pisi*.

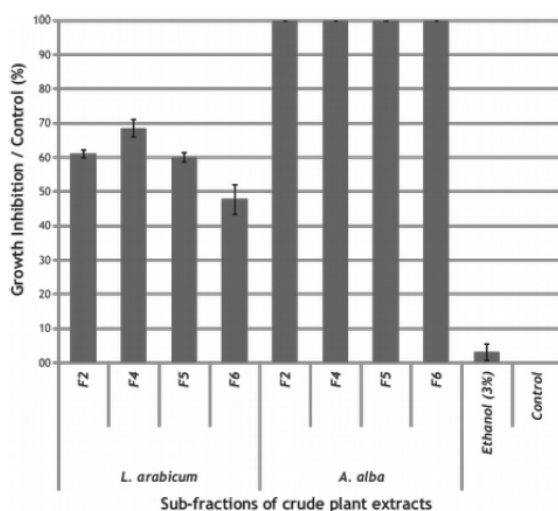
The result of the evaluation of the inhibition rates of the various crude plant extracts, it appeared to us that the level of 3% of crude extract in the culture medium of the fungus constitutes the lowest effective dose where the extracts of *L. arabicum* and *A. alba* were relatively effective compared to other extracts and their crude extracts were then fractionated into four sub-fractions that we called F2, F4, F5, F6. In comparison, the effect of the sub-fractions of each of the two extracts of plant species, it seems that all the sub-fractions of *A.*

*alba* significantly inhibit ( $P < 0.01$ ) the growth of *A. pisi* compared to the sub-fractions of *L. arabicum*. The statistical treatment of the results relating to the effect of the different sub-fractions shows a significant action of the type of extract ( $P < 0.01$ ) and such results are almost similar to those reported by Tegegne *et al.* (2008) in South Africa. Unlike the effect of the type of the sub-fraction where the differences found were not statistically significant. Numerically, F4 of *L. arabicum* recorded the best rate of inhibition com-

pared to other sub-fractions of the same plant species; nevertheless this rate remains low compared to the rates recorded with all the sub-fractions from *A. alba* (Fig. 3).

The present bioassay, has allowed us to confirm the possibility of valuing some plants of the Algerian steppe known for its phylogenetic biodiversity. The valuation of these naturally growing plants, which are known for their richness in secondary metabolites such as alkaloids, phenolic compounds and essential oils, can be an important source of bioactive natural substances, antifungals especially, potentially able to substitute for conventional phytopharmaceutical products for the purpose of sustainable agriculture that protects the environment and public health.

The eight tested plants showed to be able to inhibit *in vitro* mycelial growth and sporulation at very appreciable levels. The bioassay with the sub-fractions of *A. alba* and *L. arabicum* further supports their effectiveness in biocontrolling the growth of *A. pisi* causative agents of *Ascochyta* blight. All the observations that we have been able to record through this study open up promising prospects for in plant or *in vivo* assays in addition to other trials including other species of *Ascochyta* (*P. medicaginis* var. *pinodella* and *M. pinodes*) which are also involved in *Ascochyta* blight. Moreover, it is more than necessary to deepen and push the research towards the precise identification of the chemical substances responsible for antifungal activity.



**Figura 3.** Efecto de la subfracciones de extractos de plantas crudas sobre el crecimiento micelial de *Ascochyta pisi*.

**Figure 3.** Effect of sub-fractions of crude plant extracts on mycelial growth of *Ascochyta pisi*.

## References

- Ahmed H, Chang KF, Hwang SF, Fu H, Zhou Q, Strelkov S, Conner R & Gossen B. 2015. Morphological characterization of fungi associated with the ascochyta blight complex and pathogenic Variability of *Mycosphaerella pinodes* on field pea in central Alberta. *The Crop Journal* 3: 10-18.
- Barilli E, Cobos MJ & Rubiales D. 2016. Clarification on Host Range of *Didymella pinodes* the Causal Agent of Pea *Ascochyta* Blight. *Frontiers in Plant Science* 7:592 [16].
- Bowen J K, Lewis BG & Matthews P. 1997. Discovery of the teleomorph of *Phoma medicaginis* var. *pinodella* in culture. *Mycological Research* 101(1): 80-84.
- Dalili A, Bakhtiari S, Barari H & Aldaghi M. 2015. Effect of some fungicides against the growth inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* mycelial compatibility groups. *Journal of Plant Protection Research* 55 (4): 354-361.
- Davidson JA, Hartley D, Priest M, Krysinska-Kaczmarek M, Herdina-McKay A & Scott ES. 2009. A new species of *Phoma* causes ascochyta blight symptoms on field peas (*Pisum sativum*) in South Australia. *Mycologia* 101: 120-128.
- El Guilli M, Achbani E, Fahad K & Jijakli H. 2009. Bio-pesticides: Alternatives à la lutte chimique. Symposium International «Agriculture durable en région méditerranéenne», 14-16 Mai 2009, Rabat Maroc.
- Fondevilla S, Cubero JL & Rubiales D. 2007. Inheritance of resistance to *Mycosphaerella pinodes* in two wild accessions of *Pisum*. *European Journal of Plant Pathology* 119: 53-58.
- Jones WP & Kinghorn AD. 2006. Extraction of Plant Secondary Metabolites. From: *Methods in Biotechnology, Natural Products Isolation*. Totowa: Humana Press Inc.
- Mahlo SM, McGaw LJ & Eloff JN. 2010. Antifungal activity of leaf extracts from South African trees against plant pathogens. *Crop Protection* 29: 1529-1533.
- Ogbebor N & Adekunle AT. 2005. Inhibition of conidial germination and mycelial growth of *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt) of rubber (*Hevea brasiliensis* muell. Arg.) using extracts of some plants. *African Journal of Biotechnology* 4(9): 996-1000.
- Onfroy C, Baranger A & Tivoli B. 2007. Biotic factors affecting the expression of partial resistance in pea to ascochyta blight in a detached stipule assay. *European Journal of Plant Pathology* 119: 13-27.
- Pretorius JC, Craven P & Van der Watt E. 2002. *In vivo* control of *Mycosphaerella pinodes* on pea leaves by a crude bulb extract of *Eucomis autumnalis*. *Annals of Applied Biology* 141: 125-131.
- Schoeny A, Jumel S, Rouault F, Le May C & Tivoli B. 2007. Assessment of airborne primary inoculum availability and modelling of disease onset of ascochyta blight in field peas. *European Journal of Plant Pathology* 119: 87-97
- Tadja A, Youcef Benkada M, Rickauer M, Bendahmane BS & Benkhelifa M. 2009. Characterization of *Ascochyta* as Pathological Species of Pea (*Pisum sativum* L.) at the North-West of Algeria. *Journal of Agronomy* 8(3): 100-106.

- Tivoli B & Banniza S. 2007. Comparison of the epidemiology of ascochyta blights on grain legumes. *European Journal of Plant Pathology* 119: 59-76.
- Teegne G, Pretorius JC & Swart WJ. 2008. Antifungal properties of *Agapanthus africanus* L. extracts against plant pathogens. *Crop Protection* 27: 1052-1060.
- Tran HS, You MP, Lanoiselet V, Khan T N & Barbetti M J. 2014. First Report of *Phoma glomerata* Associated with the Ascochyta Blight Complex on Field Pea (*Pisum sativum*) in Australia. *Plant disease* 98 (3): 427-427.

## Chapitre III : Activité antifongique *in-vivo* des extraits végétaux

### III-1. Résultats

#### III-1-1. Phytotoxicité des extraits végétaux

La figure 63 représente les résultats des tests de phytotoxicité des extraits végétaux à l'égard des plantes de pois chiche et des folioles de pois. De cette figure, il apparaît clairement que, comparativement aux plantes et aux folioles des lots traités au fongicide et celles du lot témoin, les extraits végétaux de *A. alba* et de *P. harmala*, appliqués à une dose de 6%, ne présentent aucune toxicité apparente.

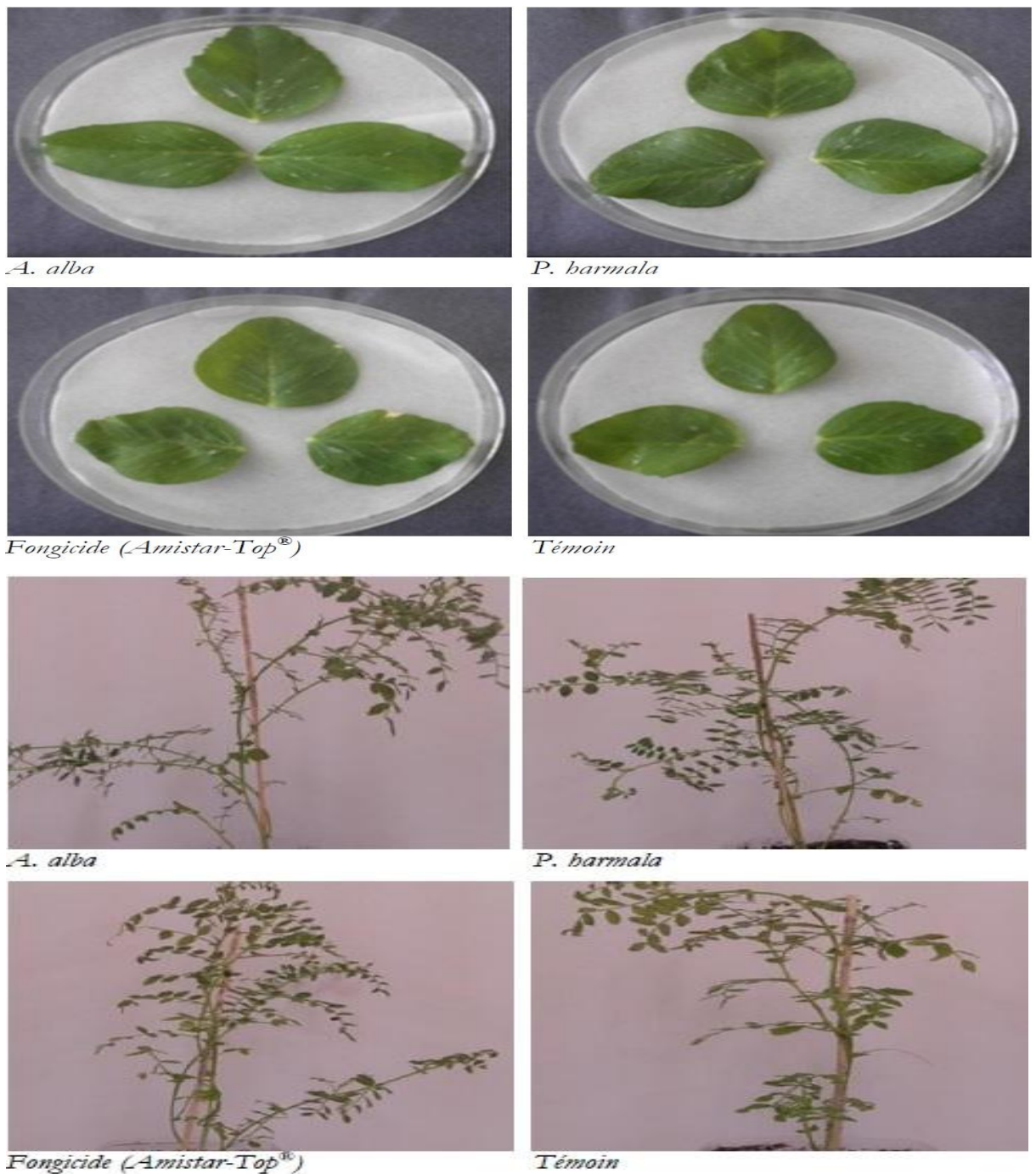


Figure 63 : Phytotoxicité des extraits végétaux. haut : sur pois, bas : sur pois chiche

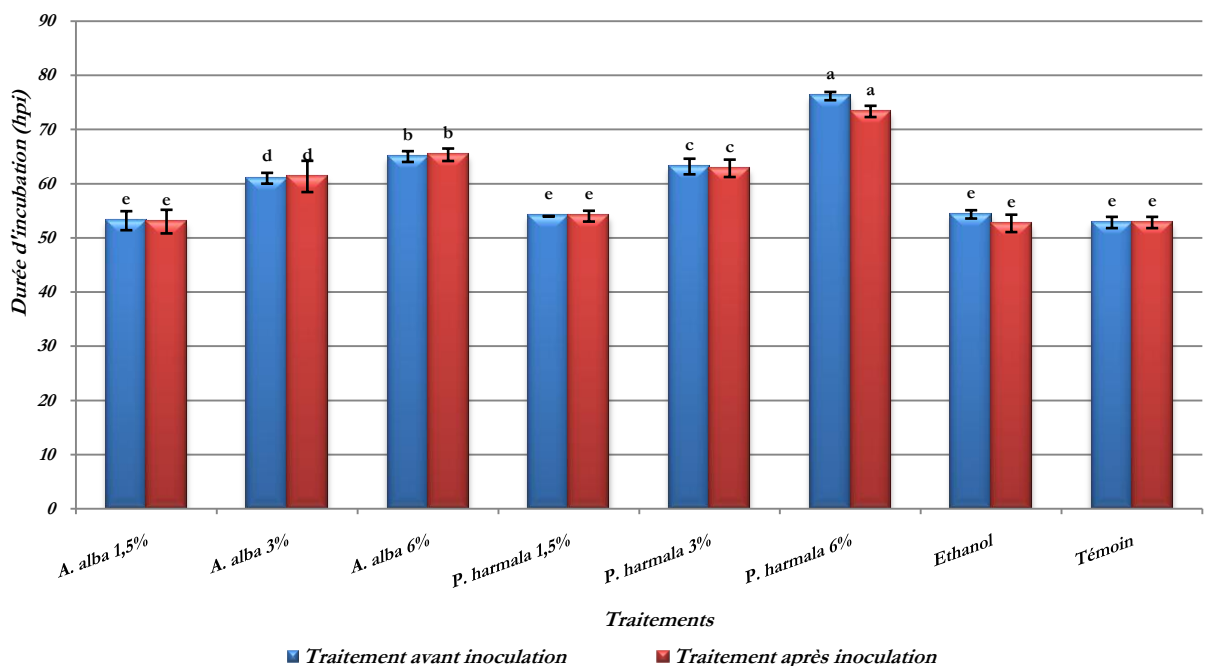
### III-1-2. Bioessai sur pois

Ce bioessai est réalisé dans le but de tester *in-vivo* les extraits végétaux bruts de *A. alba* et de *P. harmala* sur l'ascochytose, provoquée artificiellement sur des folioles de pois. L'efficacité de ces extraits comme traitement anti-ascochyitique préventif et/ou curatif est jugée à travers l'évaluation de leurs effets à différentes doses sur la durée d'incubation et la durée de latence des agents causals ainsi que sur la sévérité de la maladie.

#### III-1-2-1. Effet des extraits bruts sur la durée d'incubation des pathogènes

Partant du moment de l'inoculation des folioles, la durée d'incubation des agents causals de l'ascochytose du pois à savoir *A. pinodes*, *P. medicaginis var. pinodella* et *A. pisi*, pris ensemble, a été mesurée dans les lots subissant le traitement aux extraits végétaux, dans le lot témoin solvant (éthanol) ainsi que dans le lot témoin (lot de folioles inoculées). Les résultats de ces mesures sont détaillés dans la figure 64.

Statistiquement, le temps de traitement comme facteur étudié et son interaction avec le facteur type de traitement, n'ont pas eu d'influence significative sur la durée d'incubation des agents phytopathogènes ( $P > 0,05$ ). Quelque soit le traitement, cette durée ne varie que très sensiblement entre les traitements précédant l'inoculation d'une part et ceux qui la succèdent d'autre part. Contrairement au facteur temps de traitement, le facteur type traitement a joué un rôle significatif ( $P < 0,05$ ) en départageant les moyennes des durées d'incubation suivant le traitement appliqué aux folioles du pois.



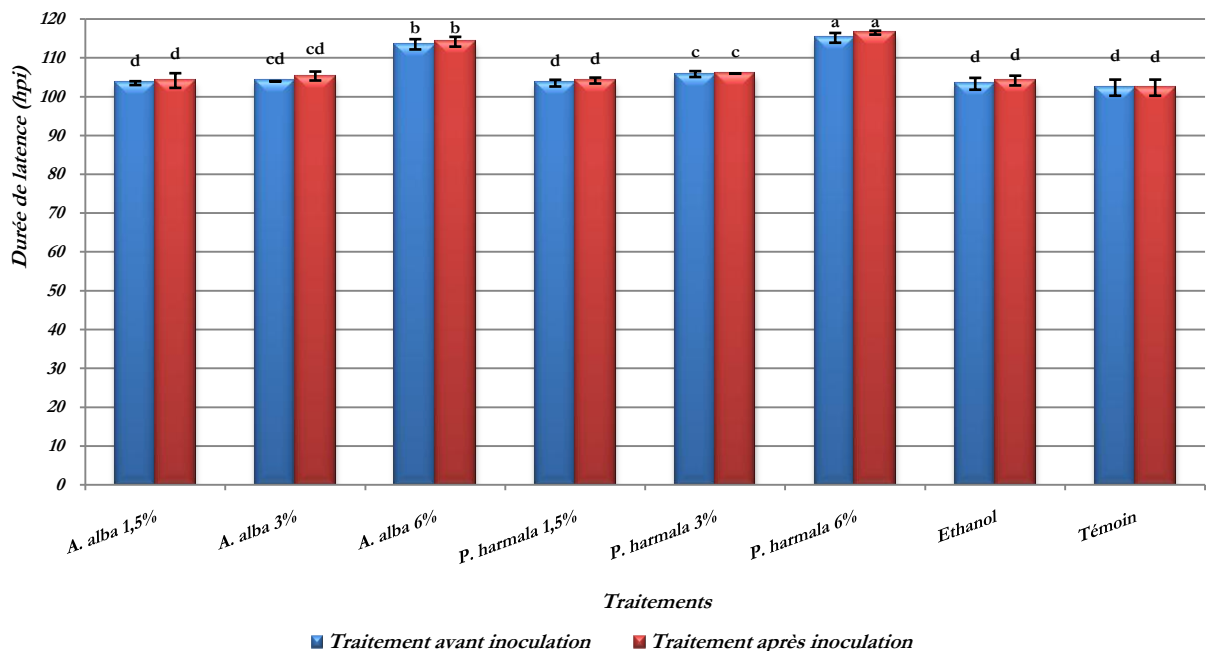
hpi : heure post-inoculation, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour  $n = 3$ , Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

**Figure 64 :** Effet des extraits végétaux bruts sur la durée d'incubation des pathogènes sur pois

Avec des traitements effectués avant inoculation ou après, l'extrait brut de *P. harmala* à 6% semble être le plus efficace en allongeant la durée d'incubation par rapport au témoin de plus de 22 hpi (heure post-inoculation) en moyenne, avec un traitement à la même dose avec l'extrait de *A. alba*, la durée d'incubation se trouve allongée de plus de 13 hpi. S'agissant des traitements appliqués à 3%, l'augmentation de la durée d'incubation oscille entre un peu plus de 10 hpi pour l'extrait de *P. harmala* et plus de 8 hpi pour celui de *A. alba*. En ce qui concerne les traitements à la dose 1,5%, tous extraits confondus, la durée d'incubation des pathogènes ne varie que très peu voire pas comparativement à celle enregistrée avec le traitement témoin.

### III-1-2-2. Effet des extraits bruts sur la durée de latence des pathogènes

La durée de latence des champignons phytopathogènes inoculés sur folioles du pois à été également mesurée en partant de l'inoculation jusqu'à ce que les premières propagules reproductives (pynides) soient apparues. La durée de latence est déterminée pour l'ensemble des traitements appliqués aux folioles en tenant compte le temps d'application des traitements. Les différentes durées de latence enregistrées suivant le type et le temps du traitement sont rapportées dans la figure 65.



hpi : heure post-inoculation, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour  $n = 3$ , Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

**Figure 65 :** Effet des extraits végétaux bruts sur la durée de latence des pathogènes sur pois

Contrairement aux durées d'incubation, les durées de latence semblent être affectées par le temps d'application des traitements. Les variations notées à ce sujet, aussi faibles qu'elles soient, sont significatives sur le plan statistique ( $P < 0,05$ ). De même, ces durées sont apparues également dépendantes du facteur type de traitement qui a exercé un

effet significatif sur leur variation suivant le traitement pratiqué ( $P < 0,05$ ). Toutefois, l'interaction entre le temps et le type de traitement n'a pas eu d'effet significatif ( $P > 0,05$ ).

Par traitement, c'est aussi avec 6% d'extrait de *P. harmala* et celui de *A. alba* que les durées de latence durent plus longtemps qu'avec le traitement témoin. L'allongement de la latence des pathogènes dans ce sens est respectivement de l'ordre de 13 et 11 hpi en moyenne. Quant aux autres traitements, les différences enregistrées comparativement au témoin restent très infimes.

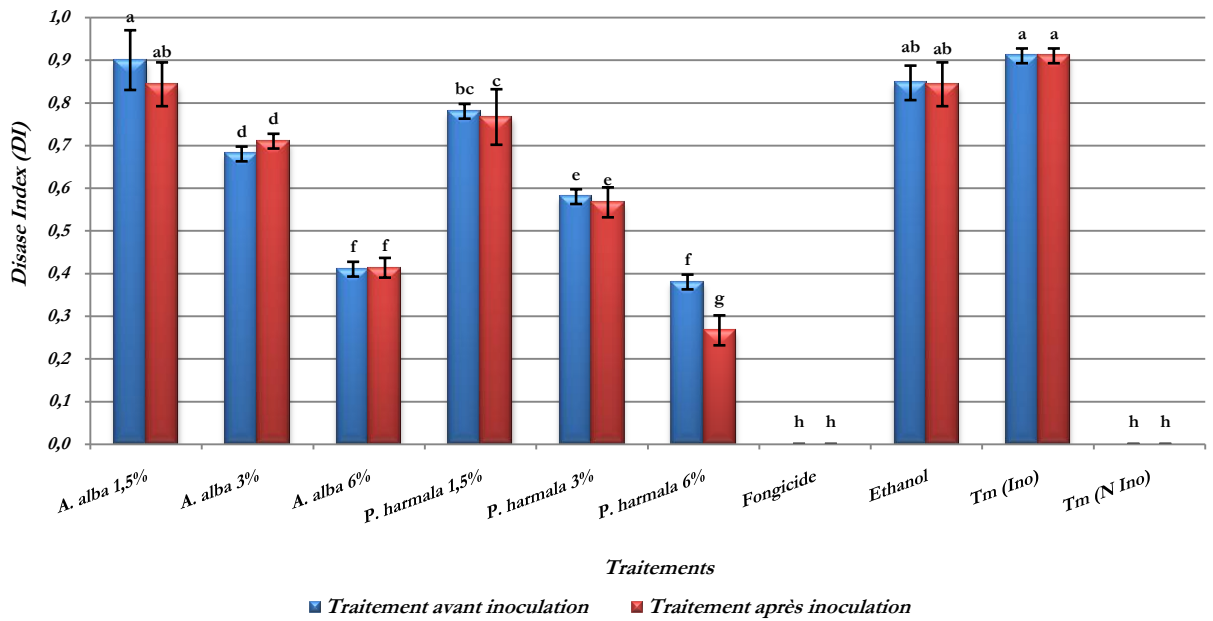
### **III-1-2-3. Effet des extraits bruts sur la sévérité de la maladie**

La sévérité de l'ascochyte sur folioles du pois, exprimée en *DI* (*Disease Index*), a été évaluée au 18<sup>ème</sup> jour après inoculation ou dpi (*day post-inoculation*) pour l'ensemble des traitements. Les résultats relatifs à cette évaluation sont représentés dans la figure 66. De cette figure, il y a lieu de noter que des traitements à 3 et à 6% d'extraits de *P. harmala* et de *A. alba* réduisent la sévérité de l'ascochyte, particulièrement à 6%. En revanche, les niveaux sont presque identiques pour le reste des traitements, quelque soit le temps de leur application, les différences entre une application de traitements avant inoculation ou après sont statistiquement insignifiantes ( $P > 0,05$ ). Par ailleurs, il est clair que pour les deux temps, le type de traitement a influencé significativement la sévérité de l'ascochyte ( $P < 0,01$ ).

Excepté le niveau nul de la maladie dans le cas d'un traitement fongicide conventionnel (Figure 67), les extraits végétaux ont agi différemment suivant leur origine botanique et la dose à laquelle sont appliqués. A ce sujet, l'effet sur la sévérité de la maladie est proportionnel à la dose au sein du même extrait dans la mesure où un traitement à 6% d'extrait végétal s'avère plus efficace que des traitements à des doses de 3 ou 1,5%. Par ailleurs, les niveaux de sévérité enregistrés dans le cas des traitements avec l'extrait de *P. harmala* restent inférieurs à ceux issus des traitements avec l'extrait de *A. alba* quelque soit la dose.

Comparativement au traitement témoin inoculé, la sévérité de l'ascochyte est réduite de plus de 23% en moyenne, si les folioles du pois sont traitées, avant ou après inoculation, avec l'extrait de *A. alba* à une dose de 3% contre une réduction moyenne s'approchant de 55%, si cet extrait est appliqué à 6%, néanmoins, avec une dose de 1,5%, les niveaux de réduction de la sévérité de la maladie sont insignifiants. Quant aux traitements avec l'extrait de *P. harmala*, la sévérité s'est trouvée réduite de 15 et de 36%, respectivement à des traitements de 1,5 et 3% d'extrait. En revanche, les taux de réduction enregistrés dans le cas d'un traitement à une dose de 6% de cet extrait, variaient

entre 58 et 70%, respectivement à des traitements réalisés avant et après inoculation des folioles.



Fongicide : Amistar-Top®, Tm (Ino) : Témoin inoculé, Tm (N Ino) : Témoin non inoculé, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour n = 3, Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

**Figure 66 :** Effet des extraits végétaux sur la sévérité de l'ascochytose sur folioles détachées pois.



**Figure 67 :** Effet des extraits végétaux sur les symptômes de l'ascochytose sur folioles de pois.

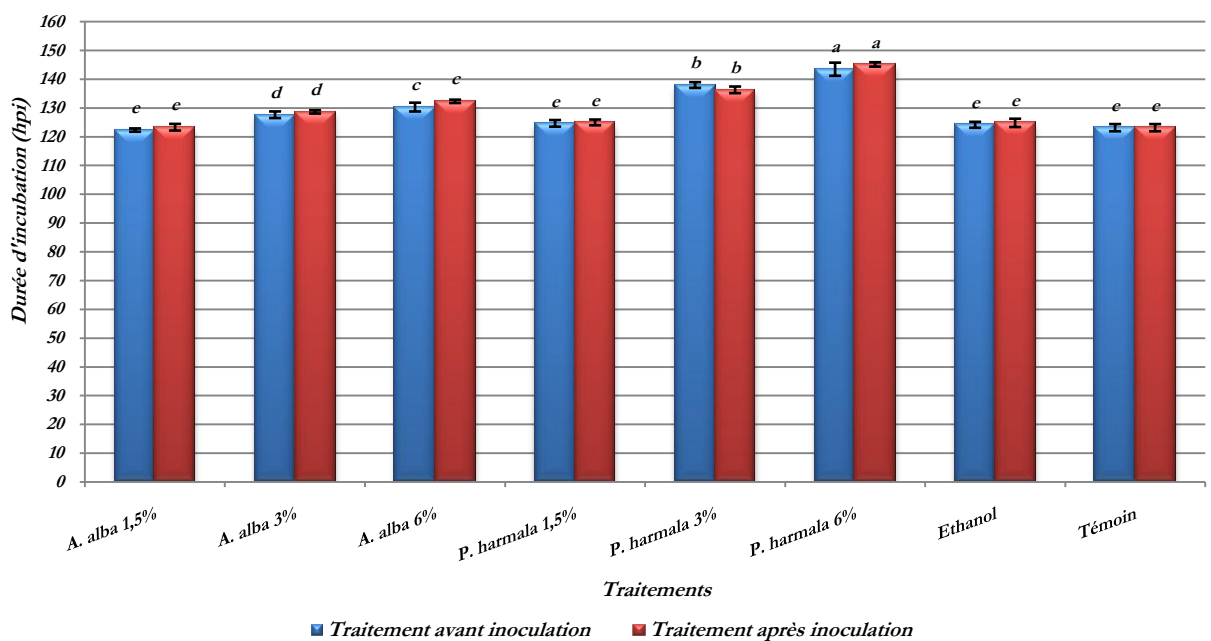
Du haut en bas et de gauche à droite : A. alba 1,5, 3, 6% ; P. harmala 1,5, 3, 6% ; Fongicide ; Ethanol ; Témoin inoculé, Témoin non inoculé.

### III-1-3. Bioessai sur pois chiche

Contrairement au bioessai sur pois, les tests sur pois chiche sont réalisés sur des plantes entières. L'effet des extraits végétaux bruts, comme traitement contre l'ascochytose, est évalué sur les durées d'incubation et de latence de *A. rabiei* et sur la sévérité de la maladie exprimée en *DI* (*Disease Index*).

#### III-1-3-1. Effet des extraits bruts sur la durée d'incubation du pathogène

L'évaluation de la durée d'incubation de *A. rabiei* suivant les différents traitements appliqués aux plantes de pois chiche avant ou après inoculation, a permis de noter les résultats illustrés ci-après dans la figure 68. L'analyse statistique de ces résultats a montré que les variations de la durée d'incubation du pathogène ne dépendent que du type de traitement, pour lequel l'effet exercé est significatif ( $P < 0,01$ ) alors que, l'effet du facteur temps ainsi que son interaction avec le facteur type de traitement s'est avéré non significatif ( $P > 0,05$ ).



hpi : heure post-inoculation, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour  $n = 3$ , Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

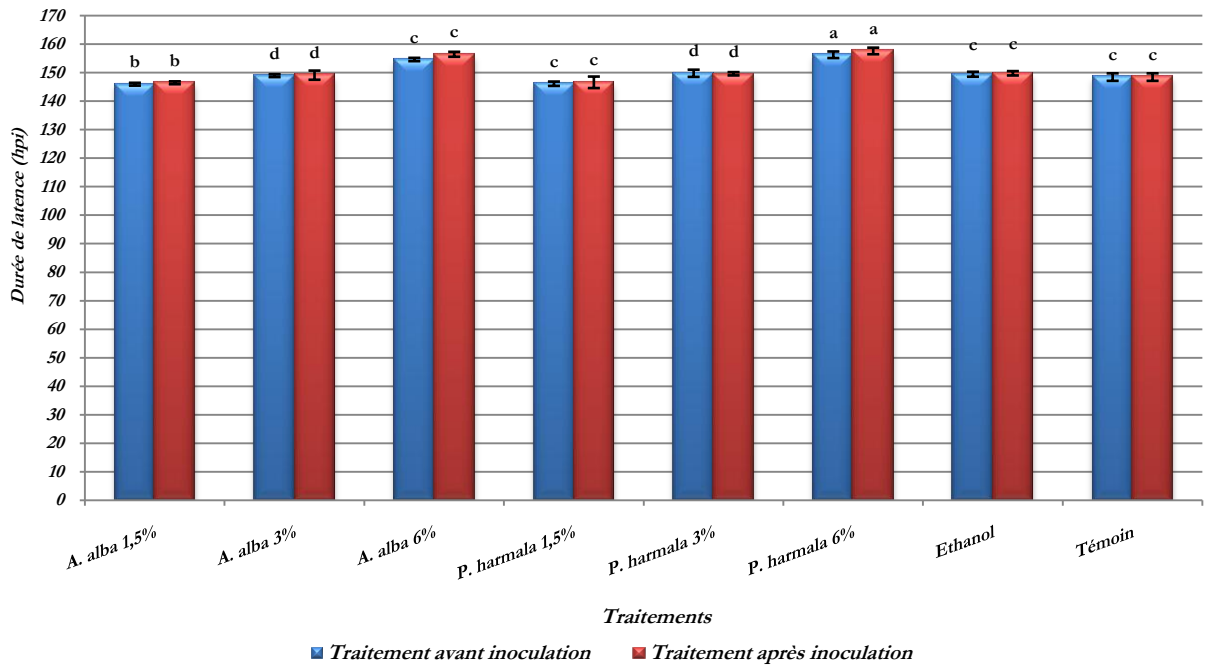
**Figure 68 :** Effet des extraits végétaux bruts sur la durée d'incubation du pathogène sur pois chiche

Indépendamment du temps de traitement, il y a lieu de signaler quelques allongements dans la durée d'incubation de *A. rabiei* comparativement au témoin. Un traitement aux extraits végétaux de *P. harmala* et de *A. alba* à une dose de 6%, a pu allonger cette durée de 21 et 7,5 hpi respectivement. Lorsque les extraits de ces deux espèces végétales sont appliqués à une dose de 3%, les écarts par rapport au témoin diminuent mais, ils restent toujours supérieurs, si les plantes de pois chiche sont traitées avec l'extrait de *P. harmala* que dans le cas d'un traitement avec celui de *A. Alba*. En effet,

la durée d'incubation enregistre une augmentation avoisinant les 14 hpi sous l'action de l'extrait de *P. harmala* contre 5 hpi avec celui de *A. alba*. Néanmoins, pour des traitements à 1,5% d'extrait végétal, la durée d'incubation du pathogène ne varie que très légèrement.

**III-1-3-2. Effet des extraits bruts sur la durée de latence du pathogène**

Les résultats de l'évaluation de la durée de latence de *A. rabiei*, sont illustrés dans la figure 69. L'analyse de ces résultats montre que le comportement du pathogène en matière de durée de latence est globalement semblable quelque soit le temps auquel les plantes de pois chiche sont traitées. A cet effet, traiter les plantes avant inoculation ou après, semble sans effet significatif sur la durée de latence ( $P > 0,05$ ). En revanche, cette durée a significativement varié d'un type de traitement à un autre ( $P < 0,01$ ).



hpi : heure post-inoculation, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour n = 3, Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

**Figure 69 :** Effet des extraits végétaux bruts sur la durée de latence du pathogène sur pois chiche

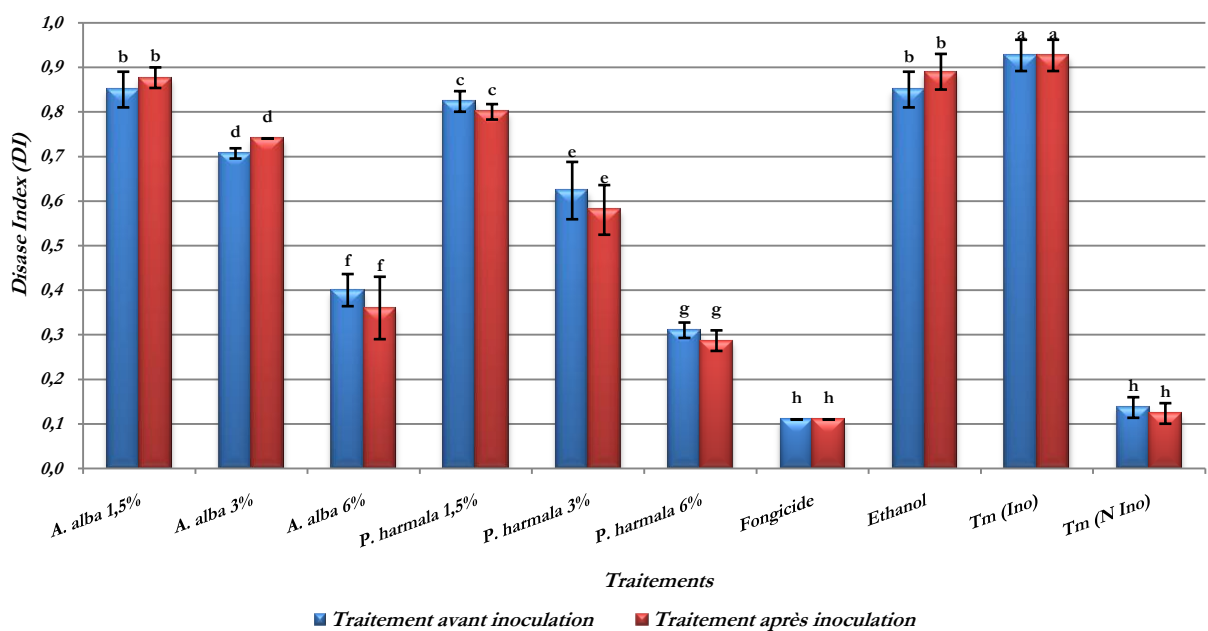
Pareillement à la durée d'incubation, des traitements à une dose de 6% d'extrait influencent plus la durée de latence que le reste des traitements. Cette durée a enregistré un allongement de plus de 8 hpi, dans le cas d'un traitement à l'extrait de *P. harmala* contre 7 hpi si le traitement est à l'extrait de *A. alba*. Quant aux doses de 3 et 1,5%, les variations enregistrées restent très faibles.

**III-1-3-3. Effet des extraits bruts sur la sévérité de la maladie**

La figure 70, illustre les résultats d'étude de l'effet des extraits végétaux bruts sur la sévérité de l'ascochytose sur pois chiche, évaluée à 18 dpi. Ces résultats expriment

les niveaux de sévérité dans le cas où les traitements sont effectués avant inoculation des plantes de pois chiche ainsi que ceux où les plantes sont traitées après inoculation. L'analyse statistique de ces résultats montre que le facteur temps de traitement et son interaction avec le facteur type de traitement n'ont pas eu de rôle significatif sur les niveaux de la sévérité de la maladie ( $P > 0,05$ ). Par contre, les différences enregistrées suite à la comparaison des niveaux de sévérité, issus des différents traitements, sont dues à un effet significatif du facteur traitement ( $P < 0,01$ ).

Tout d'abord, il faut signaler que contrairement à tous les traitements, les plantes de pois chiche subissant un traitement fongicide conventionnel restent indemnes de maladie (Figure 71). En ce qui concerne les autres traitements, la tendance générale des niveaux de la sévérité de l'ascochytose est globalement superposable à celle suivie dans l'essai sur folioles de pois. Cependant, l'effet exercé par les extraits de *P. harmala* et de *A. alba* restent très tributaire et proportionnel à la dose. L'ascochytose, à cet effet est moins prononcée à fortes doses qu'aux faibles doses d'extrait.



Fongicide : Amistar-Top®, Tm (Ino) : Témoin inoculé, Tm (N Ino) : Témoin non inoculé, Barres verticales : Erreur Standard (SD) pour  $n = 3$ , Lettres minuscules : Groupes homogènes issues du test de Newman-Keuls à 5%.

**Figure 70** : Effet des extraits végétaux sur la sévérité de l'ascochytose sur pois chiche.

Tenant compte de l'origine botanique de l'extrait, des différences notables sont enregistrées entre les deux extraits végétaux, particulièrement aux doses de 3 et 6%. Par rapport aux plantes du lot témoin inoculé, un traitement avec 3% d'extrait de *A. alba*, diminue la sévérité de la maladie de 24% s'il est appliqué avant inoculation et de 21%, dans le cas où ce traitement la succède. Respectivement, les taux de diminution sont de l'ordre de 33 et 37% avec un traitement à la même dose de l'extrait de *P. harmala*, alors

qu'à 6% d'extrait, les taux enregistrés sont à 57 et 61% pour l'extrait de *A. alba* et de 66 et 68% lorsqu'il s'agit d'un traitement à l'extrait de *P. harmala*.



**Figure 71 :** Effet des extraits végétaux sur les symptômes de l'ascochytose sur pois chiche.

Du haut en bas et de gauche à droite : *A. alba* 1,5, 3, 6% ; *P. harmala* 1,5, 3, 6% ; Fongicide ; Ethanol ; Témoin inoculé, Témoin non inoculé.



### III-2. Discussion

Les résultats des bioessais *in-vivo* ou *in-planta*, viennent confirmer ceux des bioessais réalisés *in-vitro*. Aux conditions de déroulement des tests, le traitement des folioles de pois et des plantes de pois chiche avec des extraits végétaux bruts de *P. barmala* et *A. alba*, semble affecter notablement les paramètres épidémiologiques mesurés ainsi que la sévérité de la maladie. L'allongement que nous avons constaté dans les durées d'incubation et de latence des agents causaux, s'est répercuté directement sur les niveaux de sévérité de l'ascochytose, provoquée artificiellement, d'autant plus que les niveaux de sévérité de la maladie les plus bas sont enregistrées lorsque les folioles du pois et les plantes du pois chiche subissent un traitement à 6% d'extraits végétaux.

La durée d'incubation d'un agent phytopathogène, définie comme étant le délai entre l'inoculation ou la contamination et l'apparition des premiers symptômes d'une part et la durée de latence qui est le temps écoulé entre l'inoculation et la genèse de nouvelles propagules reproductives d'un pathogène d'autre part, sont considérées en pathologie végétale comme les principales composantes d'une épidémie, particulièrement polycyclique (Suffert & Thompson, 2018), telle est le cas de l'ascochytose des légumineuses où cinq à dix cycles secondaire peuvent se succéder en une seule saison de culture (Strange & Scott, 2005 ; Madden & *al.*, 2007). Suffert & Thompson (2018) en suggérant que ces durées doivent être considérées en heures (hpi) et non pas en jours (dpi), avancent par ailleurs, que leur prolongement de quelques heures impacte aussitôt l'intensité et l'incidence d'une maladie ainsi que le développement spatiotemporelle d'une épidémie.

Les effets inhibiteurs des extraits provenant de *P. barmala* et de *A. alba* ou de leurs sous-fractions sur la croissance, la sporulation et la germination des conidies, expliquent à notre point de vue, l'allongement des durées d'incubation et de latence et la faiblesse des niveaux de sévérité de l'ascochytose sur pois et pois chiche comparativement aux témoins. Une sévérité faible de la maladie manifeste moins de symptômes foliaires et des tailles relativement faibles de taches nécrotiques ce qui offre à la plante hôte plus de surface photosynthétique et plus de vigueur par conséquent. Dans une étude évaluant l'effet de l'intensité des symptômes et les dimensions des taches nécrotiques sur l'activité photosynthétiques des stipules de pois, Roger et *al.* (1998) rapportent que pour une sévérité d'ascochytose notée 1 et 2 sur 5, l'activité photosynthétique est réduite de 7-18% et de 13-35% par rapport à l'activité d'une stipule saine. Pour des notes de 3 et 4, les taux de réduction de l'activité photosynthétique des stipules nécrosées oscillaient entre 55 et 90%. Tivoli et Banniza (2007), schématisent le développement épidémiologique de

l'ascochytose des légumineuses comme une course entre le développement de la plante hôte et celui de l'agent causal de la maladie. Une croissance, une germination de conidies et une sporulation faibles et/ou tardives, se manifestent directement sur la sévérité d'une maladie, suite à un déclenchement tardif et un nombre réduit de cycles épidémiques (Tivoli & *al.*, 2006 ; Suffert, 2017). Parallèlement, une sévérité moins prononcée offre à la plante hôte la possibilité de se développer plus rapidement que l'agent pathogène en acquérant au fil du temps plus de résistance à la pression de la maladie.

Comparativement aux traitements témoins, les plantes de pois chiche et les folioles du pois, traitées aux extraits végétaux ont résisté relativement mieux à la maladie, résistance qui s'est manifesté par des niveaux faibles de sévérité. Excluant le facteur variétal, puisque la lignée du pois chiche et la variété du pois, objets de l'étude sont connues pour être très sensibles à l'ascochytose, la résistance à la maladie, enregistrée n'est due, à notre sens qu'à l'effet des traitements appliqués. Basandrai et *al.* (2007) et Schoeny et *al.* (2007), rapportent que, outre les facteurs environnementaux et les facteurs intrinsèques propres à chaque pathogène, les durée d'incubation et de latence sont très liées au niveau de résistance de la plante hôte. Les composantes de la résistance d'une plante hôte comprennent, en plus de sa capacité à retarder ou à allonger les périodes d'incubation et de latence du pathogène, une résistance à l'infection (diminution de la germination, formation ou pénétration d'appressorium), une période infectieuse réduite (durée de la sporulation) et une intensité réduite de la production de spores (quantité de spores par unité de temps). (Onfroy et *al.*, 2007).

La littérature rapporte que dans des conditions de température et d'humidité propices au développement d'une épidémie ascochytique, les durées d'incubation de *A. rabiei* (Trapero-Casas & Kaiser, 1992) et de *A. pisi* (Heath & Wood, 1969) sont de 5 jours ou 120 heures contre 1 à 2 jours (24 à 48 heures) pour *A. pinodes* (Roger & *al.* 1999a), Onfroy et *al.* (1999), sans qu'ils donnent une durée d'incubation précise pour *P. medicaginis* var. *pinodella*, ils relatent qu'elle est plus longue que celle de *A. pinodes*. S'agissant des périodes de latence, elles sont de 3 à 4 jours ou 72 à 96 heures pour *A. pinodes* (Roger & *al.*, 1999a), de 5 à 6 jours (120 à 144 heures) pour *A. rabiei* (Trapero-Casas & Kaiser, 1992) et de 10 jours (240 heures) pour *A. pisi* (Heath & Wood, 1969).

En analysant ces données, il paraît que, dans les conditions de nos essais, les durées enregistrées concernant l'incubation et la latence des trois espèces du complexe ascochyta, inoculés ensemble aux folioles du pois, auraient vraisemblablement dues à l'activité de *A. pinodes*, étant donné que ses périodes sont moins longues que celles des deux autres espèces du complexe pathogène causant l'ascochytose du pois et de surcroît,

l'ensemble des spécialistes considère cette espèce comme la plus agressive et la plus importante parmi les trois.

Très peu de travaux se sont consacrés à l'étude de l'effet des substances extraites de végétaux sur les *Ascochyta spp.* et sont plus rares encore ceux s'intéressant aux effets *in-vivo* de ce type de substances. Néanmoins, il a lieu de citer quelques essais concluants et qui viennent à notre point de vue corroborer les résultats de nos essais. Pretorius et al. (2002) rapportent entre autres, des taux d'inhibition *in-vitro* de la croissance de *A. pinodes* de l'ordre de  $85 \pm 4\%$  suite à l'introduction dans le milieu de culture du champignon de 2% d'extrait brut de *Eucomis autumnalis* (Mill.) Chitt., plante de la famille des *Liliaceae* originaire de l'Afrique du sud. Les mêmes auteurs lorsqu'ils ont testé cet extrait à différentes doses dont celle suscitée, sur des folioles détachées de pois inoculées avec *A. pinodes*, ils constatent qu'identiquement à un fongicide conventionnel, ce traitement, soit appliqué avant inoculation des folioles ou après, inhibe complètement l'apparition des symptômes ou de taches nécrotiques caractéristiques de l'ascochytose et avancent que cet effet est dû à l'action anti-germinative complète des pycniospores du pathogène. Tegegne et al. (2008) rapportent également qu'un traitement avec un extrait brut de *Agapanthus africanus* (L.) Hoffmanns (*Amaryllidaceae*) à 2% réduit significativement la taille des lésions nécrotiques provoquées par *A. pinodes* sur folioles de pois qu'il soit appliqué avant ou après.

Concernant *A. rabiei* et l'ascochytose du pois chiche, la littérature ne cite pas d'études réalisées à l'échelle *in-vivo*, en revanche, dans un essai *in-vitro*, Jabeen et Javaid (2010) enregistrent un taux d'inhibition de la croissance de *A. rabiei* de 64% en moyenne lors que ce champignon est cultivé dans un milieu contenant 5% d'extrait aqueux des racines de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (*Myrtaceae*) alors que l'extrait éthanolique ne l'inhibe en moyenne que de 32%. Par ailleurs, Jabeen et al. (2011) rapportent que sur un milieu de culture contenant 5% d'extrait méthanolique des feuilles de *Melia azedarach* L. (*Meliaceae*) ou l'une de ses sous-fractions hexanique ou chloroformique, les taux d'inhibition de la croissance radiale de *A. rabiei* sont comparables à ceux enregistrés sur un milieu contenant du Mancozèbe et oscillant entre 43 et 57%.

Que se soit à l'échelle *in-vitro* ou à l'échelle *in-vivo*, les modes d'action des extraits végétaux bruts ou de leurs sous-fractions sont rarement discutés. Cependant certaines études avancent que ce genre de traitement intervient comme promoteur ou stimulateur des systèmes de défense et des barrières chimiques déployées par les plantes en réponse aux agressions biotiques, c'est le cas de l'extrait éthanolique de la réglisse, *Glycyrrhiza glabra* (*Fabaceae*) qui d'après Scherf et al. (2012), agit de deux façons

complémentaires, l'une directe sur *Pseudoperonospora cubensis*, agent du mildiou du concombre, l'autre est indirecte en stimulant la défense de la plante hôte. D'autres études, attribuent et lient directement le mode d'action des extraits végétaux et leurs sous-fractions à celui des métabolites secondaires qu'ils les constituent. Ces métabolites, dont la plupart d'entre eux agissent plausiblement en inhibant la germination des spores, la croissance ou la sporulation des agents phytopathogènes suite à leur action au niveau cellulaire. Cette action peut être soit directe lorsqu'elle se manifeste par un effet fongitoxique ou par interférence et perturbation des échanges transmembranaires, soit indirecte quand il s'agit d'une induction ou d'une élicitation de la synthèse des phytoalexines et des PR-*Proteins* (Stangarlin & *al.*, 1999).

En décrivant le mode d'action des extraits végétaux au niveau métabolique, Khan et Nasreen (2010) relatent qu'il peut s'agir d'une action inhibitrice de la synthèse des constituants de la paroi de la cellule fongique ou d'un effet inhibiteur d'enzymes telles que, la catalase qui sert à détoxifier le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou encore les cellulases secrétées par les champignons et dont l'action cellulolytique est nécessaire à l'invasion des tissus végétaux.

# **Conclusion générale et perspectives**

## Conclusion générale et perspectives

L'ascochytose est l'une des contraintes phytosanitaires qui s'opposent le plus au développement des cultures des légumineuses alimentaires dans tous les pays producteurs y compris l'Algérie. La complexité épidémiologique de la maladie (la multiplicité des sources d'inoculum primaire, le caractère polycyclique des épidémies) et l'absence de variétés résistantes font que les recours aux traitements chimiques restent encore les moyens le plus efficaces en matière de lutte anti-ascochyte.

En dépit des interventions multiples pendant une seule saison de culture, des coûts élevés des traitements chimiques et les risques d'apparition de souches résistantes de pathogènes, l'exigence du consommateur, de plus en plus ressentie, d'une alimentation saine et exempte de résidus de produits phytosanitaires et la nocivité avérée de ces derniers vis-à-vis de l'environnement et de la santé publique, orientent les recherches vers la nécessité de la mise en pratique de modèles agroécologiques de production intégrant à la fois la productivité agricole et la protection de la santé de l'homme et la préservation de la faune et de la flore. C'est dans cette démarche que nous avons inscrit nos travaux qui visent indissociablement la recherche d'alternatives naturelles et inoffensives aux traitements phytosanitaires conventionnels en matière de lutte contre l'ascochytose des légumineuses d'une part et la valorisation de ressources phytogénétiques locales d'autre part.

Beaucoup de travaux sont consacrés à l'étude de l'effet d'extraits végétaux sur des champignons phytopathogènes et la majorité de ces études se limitent souvent aux effets *in-vitro* sur la croissance mycélienne et non pas sur la sporulation et la germination des conidies fongiques que les spécialistes considèrent comme plus importantes d'un point de vue épidémiologique. Toutefois, très peu de travaux se sont intéressés aux effets de ce type de produits à l'égard des *Ascochyta spp.*, ceux étudiant l'action antifongique *in-planta* sont encore plus rares.

Les résultats de l'ensemble des bioessais effectués, particulièrement ceux effectués *in-vivo*, viennent démontrer davantage que les substances d'origines botaniques, surtout celles issues du métabolisme secondaires des végétaux, sont douées d'activité ou d'action biologique susceptible d'être exploitée comme traitement antifongique. A cet effet, *Artemisia campestris* L. et *Peganum harmala* Linn., plantes poussant spontanément dans la steppe du Hodna (Algérie), s'avèrent intéressantes comme espèces aptes à faire valoir en tant que sources disponibles et accessibles de phytocomposés présentant une activité antifongiques.

Les extraits éthanoliques bruts issus de ces deux espèces végétales ainsi que leurs alcaloïdes, leurs terpènes et stérols et leurs composés phénoliques se sont nettement démarqué des autres plantes testées en exerçant à l'échelle *in-vitro* et à l'échelle *in-vivo* ou *in-planta*, sous les conditions propres à nos bioessais, une activité anti-ascochytiqne notable, quoique il est très tôt de ce prononcer définitivement quant à leur substitution aux produits chimiques déjà utilisés.

Un profilage phytochimique plus profond et une détermination précise des molécules responsables de l'activité antifongique sont à envisager préalablement aux études des modes d'action et aux études toxicologiques. Des essais sous des conditions de plein champ, des essais de traitement de semences visant l'inoculum séminicole et des essais étudiant l'effet de ces extraits sur les téléomorphes sont impérativement à prévoir dans des projets futurs qui permettront, une fois concluants, la conception de biofongicides à base d'extraits ou de molécules issues de ces plantes.

Malgré que ces produits botaniques n'auront peut être pas la même efficacité que celle des fongicides de synthèse, il sera beaucoup plus question de produits aptes à être intégrés dans une stratégie globale de gestion de l'ascochytose qui doit conjuguer également la mise en pratiques de techniques culturales, l'utilisation ou l'exploitation des ressources de résistances variétales et la réduction, autant que possible, de l'utilisation d'intrants chimiques en vue de produire mieux et de manière propre, durable et éco-responsable tout en respectant les limites écologiques et socioéconomiques.

**Références  
bibliographiques**

## Références bibliographiques

- Abarca-Vargas R., Peña Malacara C.F. & Petricevich V.L.** (2016). Characterization of Chemical Compounds with Antioxidant and Cytotoxic Activities in *Bougainvillea x buttiana* Holttum and Standl, (var. Rose) Extracts. *Antioxidants* 5 (45): 1-11.
- Abbassy M.A., Abdelgaleil S.A.M., Belal A-S.H., Abdel Rasoul M.A.A.** (2007). Insecticidal, antifeedant and antifungal activities of two glucosides isolated from the seeds of *Simmondsia chinensis*. *Industrial Crops and Products* 26: 345–350.
- Abd-Alla M.A. & Haggag W.M.** (2013). Use of some plant essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of anthracnose disease of mango fruits (*Mangifera indica* L.) caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (penz). *International Journal of Agriculture and Forestry* 3(1): 1–6.
- Agrios G.N.** (2005). Plant Pathology. fifth Edition. *Elsevier Academic Press. Burlington, MA, USA.* 948p.
- Ahmed H., Chang K-F., Hwang S-F., Fu H., Zhou Q., Strelkov S., Conner R., Gossen B.** (2015). Morphological characterization of fungi associated with the ascochyta blight complex and pathogenic variability of *Mycosphaerella pinodes* on field pea crops in central Alberta. *The Crop Journal* 3: 10–18.
- Ahmed S., Abang M.M. & Maalouf F.** (2016). Integrated management of Ascochyta blight (*Didymella fabae*) on faba bean under Mediterranean conditions. *Crop Protection* 81: 65-69.
- Ahmed S., Morrall R.A.A. & Kaiser W.J.** (1996a). Distribution of mating types of *Ascochyta fabae* f. sp. lentis. *Can. J. Plant Pathol.* 18: 347-353.
- Ahmed S., Morrall R.A.A. & Sheard J.W.** (1996b). Virulence of *Ascochyta fabae* f. sp. lentis on lentil. *Can. J. Plant Pathol.* 18:354-361.
- Aires A., Mota V.R., Saavedra M.J., Monteiro A.A., Simões M., Rosa E.A.S. & Bennett R.N.** (2009). Initial in vitro evaluations of the antibacterial activities of glucosinolate enzymatic hydrolysis products against plant pathogenic bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 106: 2096–2105.
- Akamatsu H.O., Chilvers M.I, Kaiser W.J. & Peever T.L.** (2012). Karyotype polymorphism and chromosomal rearrangement in populations of the phytopathogenic fungus, *Ascochyta rabiei*. *Fungal Biology* 116: 1119-1133.
- Akem C.** (1999). Ascochyta blight of chickpea: present status and future priorities. *International Journal of Pest Management* 45(2): 131-137.

- Akrout A., El Jani H., Amouri S. & Neffati M.** (2010). Screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of *Artemisia campestris* L., *Artemisia helba* Alba Asso, and *Thymus capitatus* Hoff. et Link. Growing wild in the southern of Tunisia. *Recent Research in Science and Technology* 2 (1): 29–39.
- Akrout A., Gonzalez L.A., El Jani H. & Madrid P.C.** (2011). Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from Southern Tunisia. *Food and Chemical Toxicology* 49: 342-347.
- Alam S.S., Bilton J.N., Slawin A.M.Z., Williams D.J., Sheppard R.N., Strange R.N.** (1989). Chickpea blight: production of the phytotoxins solanapyrones A and C by *Ascochyta rabiei*. *Phytochemistry* 28: 26–30.
- Alcerito T., Barbo F.E., Negri G., Santos D.Y.A.C., Meda C.I., Young M.C.M., Chàvez D. & Blatt C.T.T.** (2002). Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. *Biochemical Systematics and Ecology* 30: 677–683.
- Ali Q., Ahsan M., Basra S.M.A., Elahi M., Javid N. & Ahmed W.** (2011). Management of *Ascochyta* blight (*Ascochyta rabiei* Pass. Lab.) Disease of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal for Agro-Veterinary and Medical Sciences* 5 (2): 164-183.
- Ali S.M., Paterson J. & Crosby J.** (1982). A standard technique for detecting seed-born pathogène in pea, chemical control, and testing commercial seed in South Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 22: 348-352.
- Allard C., Bill L. & Touraud G.** (1993). L'antracnose du pois. Revue bibliographique et synthèse. *Agronomie* 13 : 5-24.
- Allen O.N. & Allen E.K.** (1981) The Leguminosae. *The University of Wisconsin Press, Madison, WI, USA.*
- Amadioha A.C.** (2000). Controlling rice blast in vitro and in vivo with extracts of *Azadirachta indica*. *Crop Protection*. 19: 287-290.
- Amin M. & Melkamu F.** (2014). Management of *Ascochyta* Blight (*Ascochyta rabiei*) in Chickpea Using a New Fungicide. *Research in Plant Sciences* 2 (1): 27-32.
- Amit W., Singh P.P., Sandhu K.S. & Wadhwa A.** (2002) Extraction of pisatin from pea leaves infected with *Ascochyta pisi*. *Plant Disease Research* 17: 369–370.
- Anderson A.J. & Powelson M.L.** 1979. Production of plant cell wall degrading enzymes by *Phoma medicaginis* f. sp. *pinodella*. *Phytopathology* 69: 372–375.

- Angelini R., Bragaloni M., Federico R., Infantino A. & Porta-Puglia A.** (1993). Involvement of polyamines, diamine oxidase and peroxidase in resistance of chickpea to *Ascochyta rabiei*. *Journal of Plant Physiology* 142: 704–709.
- Armstrong C.L., Chongo G., Gossen B.D. & Duczek L.J.** (2001) Mating type distribution and incidence of the teleomorph of *Ascochyta rabiei* (*Didymella rabiei*) in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 110–113.
- Armstrong-Cho C., Chongo G., Wolf T., Hogg T., Johnson E. & Banniza S.** (2008). The effect of spray quality on ascochyta blight control in chickpea. *Crop Protection* 27: 700–709.
- Atik O., Ahmed S., Abang M.M., Imtiaz M., Hamwiah A., Baum M., El-Ahmed A., Murad S. & Yabrak M.M.** (2013). Pathogenic and genetic diversity of *Didymella rabiei* affecting chickpea in Syria. *Crop Protection* 46: 70-79.
- Aveskamp M.M., Gruyter de J., Woudenberg J.H.C., Verkley G.J.M. & Crous P.W.** (2010). Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology* 65: 1-60.
- Avila C. M., Satovic Z., Sillero J. C. & Rubiales D.** (2004). Isolate and organ-specific QTLs for ascochyta blight resistance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 108: 1071–1078.
- Aysan Y., Karatas A. & Cinar O.** (2003). Biological control of bacterial stem rot caused by *Erwinia chrysanthemi* on tomato. *Crop Protection* 22: 807–811.
- Baćanović-Šišić J., Šišić A., Schmidt J.H. & Finckh M.R.** (2018). Identification and characterization of pathogens associated with root rot of winter peas grown under organic management in Germany. *European Journal of Plant Pathology* 151(3): 745-755.
- Bahous M., Ouazzani-Touhami A., Badoc A. & Douira A.** (2005). Effet de l'Azoxytrobine sur la Pyriculariose, l'Helminthosporiose et la Curvulariose du Riz. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux* 144: 27-46.
- Bahr L., Castelli M.V., Barolo M.I., Mostacero N.R., Tosello M.E. & Lopez S.N.** (2016). *Ascochyta* blight: isolation, characterization, and development of a rapid method to detect inhibitors of the chickpea fungal pathogen *Ascochyta rabiei*. *Fungal biology* 120 (3): 424-432.
- Bahti P. & Strange R.N.**, 2004. Chemical and biochemical reactions of solanapyrone A, a toxin from the chickpea (*Cicer arietinum* L.). *plant Cell Reports* 12: 521-524.

- Bailey K.L., Gossen B.D., Lafond G.P., Watson P.R. & Derksen D.A.** (2001). Effect of tillage and crop rotation on root and foliar diseases of wheat and pea in Saskatchewan from 1991 to 1998: Univariate and multivariate analyses. *Canadian Journal of Plant Science* 81: 789-803.
- Baker R. & Paulitz T.C.** (1996). Theoretical basis for microbial interactions, leading to biological control of soil borne plant pathogens. pp. 50-79. *in: Principles and Practice of Managing Soil borne Plant Pathogens*. R. Hall (ed). *The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA*.
- Banniza S., Armstrong-Cho C. L., Gan Y. & Chongo G.** (2011). Evaluation of fungicide efficacy and application frequency for the control of ascochyta blight in chickpea. *Canadian Journal of Plant Pathology* 33 (2): 135–149.
- Banso A. & Adeyemo S.** (2006). Phytochemical screening and antimalarial assessment of *Abutilon mauritianum*, *Bacopa monnifera* and *Datura stramonium*. *Biokemistri* 18: 39–44.
- Baraza L.D., Joseph C.C., Munissi J.J.E., Nkunya M.H.H., Arnold N., Porzel A. & Wessjohann L.** (2008). Antifungal rosane diterpenes and other constituents of *Hugonia castaneifolia*. *Phytochemistry* 69: 200–205.
- Barilli E. Cobos M.J. & Rubiales D.** (2016). Clarification on Host Range of *Didymella pinodes* the Causal Agent of Pea Ascochyta Blight. *Front. Plant Sci.* 7 (592): 1-16.
- Barnes E.H.** (1979). Atlas and manual of plant pathology. *Plenum Press, New York, USA*. 338p.
- Barve M. P., Arie T., Salimath S., Muehlbauer F. J. & Peever T.L.** (2003). Cloning and characterization of the mating type (MAT) locus from *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) and a MAT phylogeny of legume associated *Ascochyta* spp. *Fungal Genetics and Biology* 39:151–167.
- Basandrai A. K., Basandrai D., Pande S., Sharma M., Thakur S.K. & Thakur H. L.** (2007). Development of ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea as affected by host resistance and plant age. *European Journal of Plant Pathology* 119: 77–86.
- Bashan Y. & De-Bashan L.E.** (2002). Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2637–2643.
- Bautista-Baños S., Hernández-López M. & Bosquez-Molina E.** (2004). Growth Inhibition of Selected Fungi by Chitosan and Plant Extracts. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22 (2): 178-186.

- Bayaa B. & Chen W.** (2011). Ascochyta Blight of Chickpea. *in*: Compendium of chickpea and lentil diseases and pests. Chen W., Sharma H. C. & Muehlbauer F. J. (eds.) *American Phytopathological Society (APS Press). MI, USA.*
- Bayaa B. & Kabbabeh S.** (2000). First record in Syria of *Didymella fabae*, the teleomorph of *Ascochyta fabae* and causal organism of faba bean blight. *Plant Diseases* 84: 1044.
- Béasse C., Ney B. & Tivoli B.** (2000). A simple model of pea (*Pisum sativum*) growth affected by *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Pathology* 49: 187–200.
- Beed F.D., Suez R.E. & Strange R.N.** (1994). Variation in the production of ascochitine by *Ascochyta fabae*. *Mycological Research* 98 (9): 1069-1076.
- Benbelkacem A.** (1988). The Role of Legumes in the Farming Systems of Algeria. pp 31-37 *in*: The Role of Legumes in the Farming Systems of the Mediterranean Areas. Osman A.E., Ibrahim M.H. And Jones M.A. (eds). *Kluwer Academic Publishers.*
- Bendahmane B.S., Benzohra I.E., Mahiout D., Benkada M.Y. & Labdi M.** (2012) Fungal Inoculum Potential on Severity of Ascochyta Blight of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Middle-East Journal of Scientific Research* 11 (5): 555-558.
- Bennett R.N. & Wallsgrove R.M.** (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* 127: 617-633.
- Bent A.F. Yu I.C.** (1999). Applications of molecular biology to plant disease and insect resistance. *Advances in Agronomy* 66: 251–298.
- Bhatla S.C.** (2018). Secondary Metabolites. pp 1099-1166. *in*: Plant Physiology, Development and Metabolism. Bhatla S.C & Lal M.A. (eds). *Springer Nature Singapore Pte Ltd.*
- Bimakr M., Abdul Rahman R., Taip F.S., Ganjloo A., Salleh L.M., Selamat J., Hamid A. & Zaidul I.S.M.** (2011). Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *food and bioproducts processing* 89: 67-72.
- Boerema G.H., de Gruyter J., Noordeloos M.E. & Hamers M.E.C.** (2004). Phoma Identification Manual: Differentiation of Specific and Infra-specific Taxa in Culture. *CABI Publishing.*
- Bol J.F., Linthorst H.J. & Cornelissen B.J.** (1990). Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Ann. Rev. Phytopathol.* 28: 113-138.

- Boudreau M.A.** (2013). Diseases in Intercropping Systems. *Annual Review of Phytopathology* 51: 499–519.
- Bouimeja B., El Hidan M.A., Touloun O., Ait Laaradia M., Ait Dra L., El Khoudri N. & Chait A., Boumezzough A.** (2018). Anti-scorpion venom activity of *Thapsia garganica* methanolic extract: Histopathological and biochemical evidences. *Journal of Ethnopharmacology* 211: 340–347.
- Boutemak K., Benali N. & Moulai-Mostefa N.** (2015). Effect of Hemicellulase on Extraction of Essential Oil from Algerian *Artemisia campestris*. *International Journal of Chemical and Molecular Engineering* 9 (12): 1508-1511.
- Bowen J.K., Lewis B.G. & Matthews P.** (1997). Discovery of the teleomorph of *Phoma medicaginis* var. *pinodella* in culture. *Mycol. Res.* 101 (1): 80-84.
- Bowness R., Gossen B.D., Chang K-F., Goswani,R., Willenborg C.J., Holtz M. & Strelkov S.E.** (2016). Sensitivity of *Mycosphaerella pinodes* to pyraclostrobin fungicide. *Plant Disease* 100: 192-199.
- Bretag T.W. & Ramsey M.** (2001). Disease caused by *Ascochyta* spp. pp 24–28. *in*: Compendium of Pea Diseases and Pests. Kraft J.M. & Pflieger F.L. (eds). American *Phytopathological Society Press. St. Paul, MN.*
- Bretag T.W.** (1985). Chemical control of ascochyta blight of field peas. *Australasian Plant Pathology* 14: 42–43.
- Bretag T.W., Keane P.J. & Price T.V.** (1995a). Effect of ascochyta blight on the grain yield of field peas (*Pisum sativum* L.) grown in southern Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 35: 531-6.
- Bretag T.W., Keane P.J. & Price T.V.** (2000). Effect of sowing date on the severity of ascochyta blight in field peas (*Pisum sativum* L.) grown in the Wimmera region of Victoria. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 40: 1113–1119.
- Bretag T.W., Keane P.J. & Price T.V.** (2006). The epidemiology and control of ascochyta blight in field peas: a review. *Australian Journal of Agricultural Research* 57: 883–902.
- Bretag T.W., Price T.V. & Keane P.J.** (1995b). Importance of seed-borne inoculum in the etiology of the ascochyta blight complex of field peas (*Pisum sativum* L.) grown in Victoria. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 35: 525–530.
- Bruns R. & Barz W.** (2001). Studies on Cell Number and Nuclei in Spores and on Ploidy Level in *Ascochyta rabiei* Isolates. *J. Phytopathology* 149 : 253-258.

- Bruns R.** (1999). Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zu pektinolytischen Enzymen, sowie zur Frage der Ploidie des phytopathogenen Pilzes *Ascochyta rabiei*. *Dissertation, Universität Münster, Münster, Germany.*
- Buskov S., Serra B., Rosa E. Sorensen H. & Sorensen, J.C.** (2002). Effects of intact glucosinolates and products produced from glucosinolates in myrosinase-catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis* Cv. Woll). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 690–695.
- Cakir A., Kordali S., Kilic H. & Kaya E.** (2005). Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 245–256.
- Campbell C.L.** (1998). Disease progress in time: modeling and data analysis. pp 181-183. *in: The Epidemiology of Plant Diseases.* Jones D.G. (ed.) *Kluwer Publishers, Dordrecht, Netherlands.*
- Champion R.** (1997). Identifier les Champignons Transmis par les Semences. *INRA, Paris, France.* 400 p.
- Cheftel J-C. & Cheftel H.** (1992). Introduction à la Biochimie et la Technologie des Aliments. Volume 1. *Techniques et Documentation, Lavoisier.* 382p.
- Chen Q., Hou L.W., Duan W.J., Crous P.W. & Cai L.** (2017). Didymellaceae revisited. *Studies in Mycology* 87: 105–159.
- Chen Q., Jiang J.R., Zhang G.Z., Cai L., & Crous P.W.** (2015). Resolving the Phoma enigma. *Studies in Mycology* 82: 137–217.
- Chen W., Coyne C.J., Peever T.L., Muehlbauer F.J.** (2004). Characterization of chickpea differentials for pathogenicity assay of ascochyta blight and identification of chickpea accessions resistant to *Didymella rabiei*. *Plant Pathol.* 53: 759-769.
- Chen W., Sharma H. C. & Muehlbauer F. J.** (2011). Compendium of chickpea and lentil diseases and pests. 175p. American Phytopathological Society (APS Press). MI, USA.
- Chen Y.M. & Strange R.N.** (1991). Synthesis of the solanapyrone phytotoxins by *Ascochyta rabiei* in response to metal cations and development of a defined medium for toxin production. *Plant Pathology* 40: 1–7.
- Chen Y.M. & Strange R.N.** (1994). Production of a proteinaceous phytotoxin by *Ascochyta rabiei* grown in expressed chickpea sap. *Plant Pathology* 43: 321–327.

- Cherouana S., Touil A. & Rhouati S.** (2013). Two Flavonoid Glycosides From *Lycium arabicum*. *Chemistry of Natural Compounds* 49 (5): 930-931.
- Chilvers M.I., Rogers J.D., Dugan F.M., Stewart J.E., Chen W. & Peever T.L.** (2009). *Didymella pisi* sp. nov., the teleomorph of *Ascochyta pisi*. *Mycological Research* 113: 391–400.
- Chongo G. & Gossen B.D.** (2001). Effect of plant age on resistance to *Ascochyta rabiei* in chickpea. *Can. J. Plant Pathol.* 23: 358–363.
- Chongo G. & Gossen B.D.** (2003). Diseases of chickpea. pp 185–190. *in: Diseases of field crops in Canada.* Bailey K.L., Gossen B.D., Gugel R.K.& Morrall R.A.A. (eds). *The Canadian Phytopathological Society, Vancouver, B.C., Canada.*
- Chongo G., Buchwaldt L., Gossen, B.D., Lafond G.P., May M.E., Johnson E.N. & Hogg T.** (2003). Foliar fungicides to manage ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) of chickpea in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25: 135–142.
- Chongo G., Gossen B.D., Buchwaldt L., Adhikari T. & Rimmer S.R.** (2004). Genetic diversity of *Ascochyta rabiei* in Canada. *Plant Disease* 88: 4-10.
- Clulow S.A. & Lewis B.G.** (1992). Expression of resistance to *Mycosphaerella pinodes* in *Pisum sativum*. *Plant Pathology* 41: 362-369
- Clulow S.A., Lewis B.G., Parker M.L. & Matthews P.** 1991. Infection of pea epicotyls by *Mycosphaerella pinodes*. *Mycological Research* 95: 817–820.
- Collard B.C.Y., Ades P.K., Pang E.C.K. Brouwer, J.B. & Taylor P.W.J.** (2001). Prospecting for sources of resistance to ascochyta blight in wild *Cicer* species. *Australian Plant Pathology* 30: 271-276.
- Collard B.C.Y., Pang E.C.K. & Taylor P.W.J.** (2003). Selection of wild *Cicer* accessions for the generation of mapping populations segregating for resistance to ascochyta blight. *Euphytica* 130: 1-9.
- Collinge D.B., Kragh K.M., Mikkelsen J.D., Nielsen K.K., Rasmussen U. & Vad K.** (1993). Plant chitinases. *The Plant Journal* 3 (1): 31-40.
- Cook R.J. & Baker K.F.** (1983). The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. *The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.*
- Cooke B.M.** (2006). Disease Assessment and Yield Loss. pp: 43-80. *in: The Epidemiology of Plant Diseases.* Cooke B.M., Jones D.G. & Kaye B. (eds). *Springer. Netherlands.*

- Copping L.G & Duke S.O.** (2007). Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Management Science* 63: 524–554.
- Coram T.E. & Pang E.C.K.** (2005). Isolation and analysis of candidate Ascochyta blight defence genes in chickpea. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 66: 201–210.
- Coram T.E. & Pang E.C.K.** (2006). Expression profiling of chickpea genes differentially regulated during a resistance response to Ascochyta rabiei. *Plant Biotechnology Journal* 4: 647–655.
- Cragg G.M., Grothaus P.G. & Newman D.J.** (2012). Natural Product in Drug Discovery: recent advances. Pp 1-27. *in: Plant Bioactives and Drug Discovery*. Cechinel-Filho V. (ed). *Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA*.
- Cullis C. & Kunert K.J.** (2016). Unlocking the potential of orphan legumes. *Journal of Experimental Botany* 68: 1895-1903.
- Dalili A, Bakhtiari S, Barari H & Aldaghi M.** 2015. Effect of some fungicides against the growth inhibition of Sclerotinia sclerotiorum mycelial compatibility groups. *Journal of Plant Protection Research* 55 (4): 354-361.
- Davidson J.A. & Kimber R.B.E.** (2007). Integrated disease management of ascochyta blight in pulse crops. *European Journal of Plant Pathology* (119): 99-110.
- Davidson J.A.** (2012). Epidemiology and management of ascochyta blight of field pea (*Pisum sativum*) in South Australia. *PhD thesis. University of Adelaide, Australia*.
- Davidson J.A., Hartley D., Priest M., Krysinska-Kaczmarek M., Herdina-McKay A. & Scott E.S.** (2009). A new species of Phoma causes ascochyta blight symptoms on field peas (*Pisum sativum*) in South Australia. *Mycologia* 101: 120-128.
- Davidson J.A., Krysinska-Kaczmarek M., McKay H.A. & Scott E.S.** (2012). Comparison of cultural growth and in planta quantification of *Didymella pinodes*, *Phoma koolunga* and *Phoma medicaginis* var. *pinodella*, causal agents of ascochyta blight on field pea (*Pisum sativum*). *Mycologia* 104: 93-101.
- Davidson J.A., Krysinska-Kaczmarek M., Wilmshurst C.J., McKay A., Herdina & Scott E.S.** (2011). Distribution and survival of ascochyta blight pathogens in field-pea cropping soils of Australia. *Plant Disease* 95: 1217-1223.
- Davidson J.A., Smetham G., Russ M.H, McMurray L., Rodda M., Krysinska-Kaczmarek M. & Ford R.** (2016). Changes in Aggressiveness of the *Ascochyta lentis* Population in Southern Australia. *Front. Plant Sci.* 7 (393): 1-16.

- Davidson J.A., Wilmshurst C.J., Scott E.S. & Salam M.U.** (2013). Relationship between ascochyta blight on field pea (*Pisum sativum*) and spore release patterns of *Didymella pinodes* and other causal agents of ascochyta blight. *Plant Pathology* 1-13.
- De Gruyter J.** (2002). Contributions towards a monograph of Phoma (Coelomycetes) — IX. Section Macrospora. *Persoonia* 18 (1): 85-102.
- Demirci F., Bayraktar H., Babaliogullu I., Dolar F.S. & Maden S.** (2003). In vitro and in vivo effect of some fungicides against the chickpea blight pathogen, *Ascochyta rabiei*. *Journal of Phytopathology*, (151) :519-524.
- Denelle N. & Puech S.** (1985). Etude caryosystematique de *Thymelaea Hirsuta* (L.) Endl. (Thymelaeaceae) dans deux stations du Littoral Méditerranéen Français (Camargue et Alberes). *Taxon* 34 (4) : 611-616.
- Devi E.L., Kumar S., Singh T.B., Sharma S.K., Beemrote A., Devi C.P., Chongtham S.K., Singh C.H., Yumlembam R.A., Haribhushan A., Prakash N. & Wani S.H.** (2017). Adaptation Strategies and Defence Mechanisms of Plants During Environmental Stress. pp 359-413. *in: Medicinal Plants and Environmental Challenges*. Ghorbanpour M. & Varma A. (eds). *Springer International Publishing*.
- Dhawan D. & Gupta J.** (2017). Comparison of Different Solvents for Phytochemical Extraction Potential from *Datura metel* Plant Leaves. *International Journal of Biological Chemistry* 11: 17-22.
- Dickinson M.** (2003). Molecular Plant Pathology. *BIOS Scientific Publishers, Taylor & Francis Group*.
- Do Q.D., Angkawijaya A.E., Tran-Nguyen P.L., Huynh L.H., Soetaredjo F.E. & Ismadji S., Ju Y-H.** (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis* 22: 296-302.
- Doebley J.F., Gaut B.S. & Smith B.D.** (2006). The molecular genetics of crop domestication. *Cell* 127: 1309-1322.
- Dolar F.S. & Gurcan A.** (1995). Physiological differences in resistant and susceptible lines to chickpea blight (*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr). *Turkish Journal of Agricultural Forestry* 19: 31–37.
- Dolar F.S.** (2010). Toxin Production and DNA Sequence Analysis of Turkish Isolates of *Ascochyta rabiei*, the Causal Agent of *Ascochyta* Blight in Chickpea. *Journal of Turkish Phytopathology* 39 (1-3): 31-37.

- Dubey N.K., Shukla R., Kumar A., Singh P. & Prakash B.** (2011). Global Scenario on the Application of Natural Products in Integrated Pest Management Programmes. pp 1-20. *in: Natural Products in Plant Pest Management.* Dubey N.K (ed). *CAB International.*
- Dugan F. M., Lupien S. L., Hernandez-Bello M., Peever T. L. & Chen W.** (2005). Fungi Resident in Chickpea Debris and their Suppression of Growth and Reproduction of *Didymella rabiei* under Laboratory Conditions. *Journal of Phytopathology* 153: 431–439.
- Dusunceli F., Meyveci K., Cetin L., Avci M., Surek D., Albustan S., Mert Z., Akan K., Karacam M., Strange R. N.** (2007). Determination of agronomic practices for the management of blight of chickpea caused by *Ascochyta rabiei* in Turkey: 1. Appropriate sowing date. *European Journal of Plant Pathology* 119: 449-456.
- Dzoyem J.P. & Kuete V.** (2013). Review of the Antifungal Potential of African Medicinal Plants. Pp 79-156. In: *Antifungal Metabolites from Plants.* Razzaghi-Abyaneh M. & Rai M. (eds). *Springer-Verlag Berlin Heidelberg ; Germany.*
- Ellwood S.R., Kamphuis L.G., & Oliver R.P.** (2006). Identification of sources of resistance to *Phoma medicaginis* isolates in *Medicago truncatula* SARDI core collection accessions, and multigene differentiation of isolates. *Phytopathology* 96: 1330-1336.
- Elzbieta Z.** (1997). Study on the influence of *Ascochyta fabae* and *Botrytis fabae* on two growing types of faba bean. pp: 539-541 in: *Diagnosis and Identification of Plant Pathogens.* Dehne H.W., Adam G., Diekmann M., Frahm I., Mauler-Machnik A. & P. Vanhalteren. (eds.). *Kluwer Academic Publishers.*
- Evidente A., Capasso R., Vurro M. & Bottalico A.** (1993a). Ascosalitoxin, a phytotoxic trisubstituted salicylic aldehyde from *Ascochyta pisi*. *Phytochemistry* 34: 995–998.
- Evidente A., Lanzetta R., Capasso R., Vurro M. & Bottalico A.** (1993b) Pinolidoxin, a phytotoxic nonenolide from *Ascochyta pinodes*. *Phytochemistry* 34: 999–1003.
- Farkas Á.** (2015). Multipurpose Herbs: Hidden Potentials and Dangers in the Garden. pp 425-434. *in: Medicinal and Aromatic Plants of the World. Scientific, Production, Commercial and Utilization Aspects.* Mâthé À. (ed). *Springer Science+Business Media Dordrecht. Germany.*
- Farr D.F., Rossman A.Y., Palm M.E. & McCray E.B.** (2010). Fungal Databases. *Online. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, USDAARS, Washinton, DC.*

- Fatehi J., Bridge P.D. & Punithalingam E. (2003).** Molecular relatedness within the “Ascochyta pinodes-complex”. *Mycopathologia* 156: 317–327.
- Fernández-Aparicio M., Amri M., Kharrat M. & Rubiales D. (2010).** Intercropping reduces *Mycosphaerella pinodes* severity and delays upward progress on the pea plant. *Crop Protection* 29: 744-750.
- Ferreira R.B., Monteiro S., R. Freitas, Santos C.N., Chen Z., Batista L.M., Duarte J., Borges A. & Teixeira A.R. (2007).** The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology* 8 (5): 677–700.
- Fleuriet A. & Macheix J.J. (2003)** Phenolic acids in fruits and vegetables. pp 1-41. *in*: Flavonoids in Health and Disease. Rice-Evans C.A. & Packer L. (eds). *Marcel Dekker, New York, USA*.
- Fondevilla S., Almeida N.F., Satovic Z., Rubiales D., Vaz Patto M.C., Cubero J.I. & Torres A.M. (2011).** Identification of common genomic regions controlling resistance to *Mycosphaerella pinodes*, earliness and architectural traits in different pea genetic backgrounds. *Euphytica* 182: 43–52.
- Fondevilla S., Avila C.M., Cubero J.I. & Rubiales D. (2005).** Response to *Mycosphaerella pinodes* in a germplasm collection of *Pisum* spp. *Plant Breeding* 124: 313-315.
- Fondevilla S., Cubero J.I. & Rubiales D. (2007).** Inheritance of resistance to *Mycosphaerella pinodes* in two wild accessions of *Pisum*. *Eur J Plant Pathol.*119: 53–58.
- Ford R., Inder P., P.W.J. & Lindbeck K. (2011).** Ascochyta Blight of Lentil. *in*: Compendium of chickpea and lentil diseases and pests. Chen W., Sharma H. C. & Muehlbauer F. J. eds. American Phytopathological Society (APS Press). MI, USA.
- Fratini R.M., De la Vega M.P. & Sánchez L.R. (2014).** pp 115-148 *in*: Broadening the Genetic Base of Grain Legumes. Singh M., Bisht I.S. & Dutta M. (eds). *Springer Science*.
- Frenkel O., Peever T.L., Chilvers M.I., Ozkilinc H., Can C., Abbo S., Shtienberg D., & Sherman A. (2010).** Ecological Genetic Divergence of the Fungal Pathogen *Didymella rabiei* on Sympatric Wild and Domesticated *Cicer* spp. (Chickpea). *Applied and Environmental Microbiology* 76 (1): 130–39.
- Gan YT., Siddique K.H.M., MacLeod W.J. & Jayakumar P. (2006).** Management options for minimizing the damage by *Ascochyta* blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crop Research* 97: 121-134.

- Garry G., Jeuffroy M.H., Ney B. & Tivoli B.** (1998). Effects of *Ascochyta* blight (*Mycosphaerella pinodes*) on the photosynthesizing leaf area and the photosynthetic efficiency of the green leaf area of dried-pea (*Pisum sativum*). *Plant Pathology* 47: 473–479.
- Ghorbanpour M., Hadian J., Nikabadi S. & Varma A.** (2017). Importance of Medicinal and Aromatic Plants in Human Life. pp 1-25. *in: Medicinal Plants and Environmental Challenges*. Ghorbanpour M. & Varma A. (eds). *Springer International Publishing*.
- Gossen B.D. & Derksen D.A.** (2003). Impact of tillage and crop rotation on *ascochyta* blight (*Ascochyta lentis*) of lentil. *Canadian Journal of Plant Science* 83: 411–415.
- Gossen B.D.** (2001). Impact of burial on survival of *Ascochyta* lentils in lentil residue. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 146–148.
- Gossen B.D., Carisse O., Kawchuk L.M., Van Der Heyden H. & McDonald M.R.** (2014). Recent changes in fungicide use and the fungicide insensitivity of plant pathogens in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 36 (3): 327–340.
- Gossen B.D., Hwang S., Conner R., & Chang K.** (2011). Managing the *ascochyta* blight complex on field pea in western Canada. *Prairie Soils & Crops Journal* 4: 135–141.
- Gossen B.D., Sheard J.W., Beauchamp C.J., & Morrall R.A.A.** (1986). *Ascochyta lentis* renamed *Ascochyta fabae* f. sp. *lentis*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 8: 154-160.
- Gossen, B.D. & Miller P.R.** (2004). Survival of *Ascochyta rabiei* in chickpea residue on the Canadian prairies. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26: 142–147.
- Grünwald N.J., Chen W., & Larsen R.C.** (2004). Pea Diseases and their Management. pp 300-331 *in: Diseases of Fruits and Vegetables, Diagnosis and Management*. Vol. II. S.A.M.H. Naqvi ed. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Gupta V.K. & Paul Y.S.** (2002). Diseases of Field Crops. pp 155-161. *Indus Publishing Company*. New Delhi, India.
- Gurjar G., Mishra M., Kotkar H., Upasani M., Soni P., Tamhane V., Kadoo N., Giri A. & Gupta V.K.** (2011). Major Biotic Stresses of Chickpea and Strategies for their Control. pp 87-134. *in: Pests and Pathogens: Management Strategies*. Vudem D.R., Poduri N.R. & Khareedu V.R. (eds). *BS Publications*.
- Gurjar M.S., Ali S., Akhtar M., Singh K.S.** (2012). Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agricultural Sciences* 3 (3): 425–433.

- Gurung A.M., Pang E.C.K., Taylor P.W.J.** (2002). Examination of Pisum and Lathyrus species as sources of ascochyta blight resistance for field pea (*Pisum sativum*). *Australasian Plant Pathology* 31: 41–45.
- Hamid K. & Strange R.N.** (2000). Phytotoxicity of solanapyrones A and B produced by the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. and the apparent metabolism of solanapyrone A by chickpea tissues. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56: 235–244.
- Hamza S., Samir S., Rebai A., Salah R., Kahl G. & Moncef H.** (2000). Pathotype variation of the representative genotypes of *ascochyta rabiei* in the Beja region. *Journal of Plant Pathology* 82 (1): 23-28.
- Hanselle T. & Barz W.** (2001). Purification and characterisation of the extracellular PR-2b  $\beta$ -1,3-glucanase accumulating in different *Ascochyta rabiei*-infected chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Plant Science* 161: 773–781.
- Harborne J.B. & Williams C.A.** (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504.
- Heath M.C. & Wood R.K.S.** (1969). Leaf spots induced by *Ascochyta pisi* and *Mycosphaerella pinodes*. *Annals of Botany* 33: 657–670.
- Herath I.H.M.H.B., Stoddard F.L. & Marshall D.R.** (2001). Evaluating faba beans for rust resistance using detached leaves. *Euphytica* 117: 47–57.
- Hernandez-Bello M. A., Chilvers M. I., Akamatsu H. & Peever T. L.** (2006). Host specificity of *Ascochyta* spp. infecting legumes of the Viciae and Cicereae tribes and pathogenicity of an interspecific hybrid. *Phytopathology* (96): 1148–1156.
- Höhl B., Pfautsch M. & Barz W.** (1990). Histology of disease development on resistant and susceptible cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) inoculated with spores of *Ascochyta rabiei*. *J. Phytopathol.* 129: 31–45.
- Honee G.** (1999). Engineered resistance against fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 105: 319–326.
- Huang J-S.** (2001). Phytotoxins and Plant Pathogenesis. pp: 291-411 *in*: Plant Pathogenesis and Resistance. Biochemistry and Physiology of Plant-Microbe Interactions. Huang J-S. (ed.). *Springer Science*.
- Hwang S.F., Su H., Chang K.F., Turnbull G.D., Blade S.F. & Howard R.J.** (2004). Characterization of the metabolite produced by *Mycosphaerella pinodes*, the causal agent of mycosphaerella blight on field peas (*Pisum sativum* L.). *Microbiological Research* 159: 187–191.

- Ilarslan H. & Dolar F.S.** (2002). Histological and ultrastructural changes in leaves and stems of resistant and susceptible chickpea cultivars to *Ascochyta rabiei*. *Journal of Phytopathology* 150: 340–348.
- Imtiaz M., Abang M., Malhotra R.S., Ahmed S., Bayaa B., Udupa S.M.** (2011). Pathotype, IV a new and highly aggressive pathotype of *Didymella rabiei*, causing *Ascochyta* blight in chickpea in Syria. *Plant Disease* 95:1192-1094.
- Iqbal E., Abu Salim K. & Lim L.B.L.** (2015). Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. *Journal of King Saud University – Science* 27: 224–232.
- Irinyi L., Kövics G.J. & Sándor E.** (2009). Taxonomical re-evaluation of *Phoma*-like soybean pathogenic fungi. *Mycological research* 113: 249-260.
- Iruela M., Castro P., Rubio J., Cubero J. I., Jacinto C., Millán T. & Gil J.** (2007). Validation of a QTL for resistance to *ascochyta* blight linked to resistance to fusarium wilt race 5 in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Eur J Plant Pathol* 119: 29–37.
- Ishida M., Hara M., Fukino N., Kakizaki T. & Morimitsu Y.** (2014) Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breeding Science* 64 (1): 48-57.
- Islam W., Qasim M., Noman A., Idrees A. & Wang L.** (2017). Genetic Resistance in Chickpea Against *Ascochyta* Blight: Historical Efforts And Recent Accomplishments. *The Journal of Animal & Plant Sciences* 27(6): 1941-1957.
- Isman M.B., Matsuura H., MacKinnon S., Durst T., Towers G.H.N. & Arnason J.T.** (1996). Phytochemistry of the Meliaceae. So many terpenoids, so few insecticides. pp 155–178. *in*: Recent Advances in Phytochemistry volume 30: Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions. Romeo, J.T., Saunders, J.A. and Barbosa, P (eds). *Plenum Press, New York. USA*.
- Jabeen K. & Javaid A.** (2010). Antifungal activity of *Syzygium cumini* against *Ascochyta rabiei* – the cause of chickpea blight. *Natural Product Research* 24 (12): 1158–1167.
- Jabeen K., Javaid A., Ahmad E. & Athar M.** (2011). Antifungal compounds from *Melia azedarach* leaves for management of *Ascochyta rabiei*, the cause of chickpea blight. *Natural Product Research* 25 (3): 264–276.
- Jaiwal P.K. & Singh R.P.** (2003). Applied Genetics of Leguminosae Biotechnology. *Springer Science+Business Media Dordrecht*. 329p.

- Jamil F.F., Sarwar N., Sarwar M., Khan J.A., Geistlinger J. & Kahl G.** (2000). Genetic and pathogenic diversity within *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. populations in Pakistan causing blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 243-254.
- Jang M., Hong E., & Kim G-H.** (2010). Evaluation of Antibacterial Activity of 3-Butenyl, 4-Pentenyl, 2 Phenylethyl, and Benzyl Isothiocyanate in *Brassica* Vegetables. *Journal of Food Science* 75 (7): 412-416.
- Jayakumar P., Gossen B.D., Gan Y.T., Warkentin T.D. & Banniza S.** (2005). *Ascochyta* blight of chickpea: infection and host resistance mechanisms. *Can. J. Plant Pathol.* 27: 499–509.
- Jeger M.J. & Viljanen-Rollinson S.L.H.** (2001). The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 32–40.
- Jellis G. J. & Punithalingam E.** (1991). Discovery of *Didymella fabae* sp. nov., the teleomorph of *Ascochyta fabae*, on faba bean straw. *Plant Pathology* 40: 150-157.
- Jellis G. J., Bond D.A. & Boulton R. E.** (1998). Diseases of faba bean. In: Allen D. J. Lenne J. M. eds. *The Pathology of Food and Pasture Legumes*. Wallingford, UK: CABI: 371-422.
- Jeyasankar A., Premalatha S., Elumalai K.** (2014). Antifeedant and insecticidal activities of selected plant extracts against *Epilachna* beetle, *Henosepilachna vigintioctopunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Advances in Entomology* 2 (1): 1–6.
- Jeyaseelan E.C., Pathmanathan M.K., & Jeyadevan J.P.** (2011). Inhibitory Effect of Different Solvent Extracts of *Vitex negundo* L. and *Allium sativum* L. on Phytopathogenic Bacteria. *Archives of Applied Science Research* 3 (1): 1-8.
- Jha A.B., Gali K.K., Tar'an B. & Warkentin T.D.** (2017) Fine Mapping of QTLs for *Ascochyta* Blight Resistance in Pea Using Heterogeneous Inbred Families. *Front. Plant Sci.* 8 (765): 1-12.
- Jhorar O.P., Mathauda S.S., Singh G., Butler D.R. & Mavi H.S.** (1997). Relationships between climatic variables and *Ascochyta* blight of chickpea in Punjab, India. *Agricultural and Forest Meteorology* 87: 171-177.
- Johansen C., Baldev B., Brouwer J.B., Erskine W., Jermyn WA., Li-Juan L., Malik B.A., Ahad Miah A. & Silim S.N.** (1994). Biotic and abiotic stresses constraining productivity of cool season food legumes in Asia, Africa and Oceania. pp 175-194. *in:*

- Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes. Muehlbauer F. J. & W. J. Kaiser, (eds.) *Kluwer Academic Publishers, Netherlands*.
- Johnson K.B. & Dileone J.A.** (1999). Effect of antibiosis on antagonist dose-plant disease response relationships for the biological control of crown gall of tomato and cherry. *Phytopathology* 89: 974–980.
- Jones W.P. & Kinghorn A.D.** (2006). Extraction of Plant Secondary Metabolites. pp 323-351. *in: Methods in Biotechnology, Vol. 20, Natural Products Isolation, 2<sup>nd</sup> edition. Sarker S.D., Latif Z., & Gray A.I. Humana Press Inc. New Jersey, USA.*
- Joshi A., Bhohe M. & Saatarkar A.** (2013). Phytochemical investigation of the roots of *Grewia microcos* Linn. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 5: 80–87.
- Kader D.A.A., El-Wakil A., Tohami M.R., Ghoniem M.I.** (1990). Effect of some agricultural practices and chemical control on the incidence of *Ascochyta* blight of chickpea. *Egyptian Journal of Phytopathology* 21: 31–43.
- Kaiser W.J. & Hannan R.M.** (1987). First report of *Mycosphaerella rabiei* on chickpeas in the Western Hemisphere. *Plant Disease* 71, 192.
- Kaiser W.J. & Hannan R.M.** (1988). Seed transmission of *Ascochyta rabiei* in chickpea and its control by seed treatment fungicides. *Seed Science and Technology* 16: 625-637.
- Kaiser W.J.** (1997). Inter- and intranational spread of *Ascochyta* pathogens of chickpea, faba bean, and lentil. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19: 215–224.
- Kaiser W.J., Ramsey M.D., Makkouk K.M., Bretag T.W., Acikgoz N., Kumar J. & Nutter F.W.** (2000). Foliar diseases of cool season food legumes and their control. pp 437–455 *in: Knight R. (ed.), Linking research and marketing opportunities for pulses in the 21<sup>st</sup> century. Proceedings of the Third International Food Legumes Research Conference. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.*
- Kaiser W.J., Wang B-C, Rogers J.D.** (1997). *Ascochyta fabae* and *A. lentis*: Host specificity, teleomorphs (*Didymella*), hybrid analysis and taxonomic status. *Plant Diseases* 81:809–816.
- Kanouni H., Taleei A. & Okhovat M.** (2011). *Ascochyta* blight (*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.) of chickpea (*Cicer arietinum* L.): Breeding strategies for resistance. *International Journal of Plant Breeding and Genetics* 5 (1): 1-22.
- Kaur M. & Deshpande K.B.** (1980). In vitro production of toxic metabolites by *Ascochyta pisi* (Pass.) Lab. inciting blight of peas (*Pisum sativum* L.). *Acta Botanica Indica* 8: 210–214.

- Kaur S.** (1995) Phytotoxicity of solanapyrones produced by the fungus *Ascochyta rabiei* and their possible role in blight of chickpea (*Cicer arietinum*). *Plant Science* 109: 23–29.
- Keinath A.P.** (2009). Sensitivity to azoxystrobin in *Didymella bryoniae* isolates collected before and after field use of strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 65: 1090–1096.
- Kemal A.** (2002). An Integrated Approach to Pest Management in Field Pea, *Pisum sativum* (L.), with Emphasis on Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *PhD thesis. University of the Free State Bloemfontein, South Africa.*
- Kemassi A., Boual Z., Lebbouz I., Daddi Bouhoun M., Saker M.L., Ould El Hadj-Khelil A. & Ould El Hadj M.D.** (2012). Etude de l'Activité Biologique des Extraits Foliaires de *Cleome arabica* L. (Capparidaceae). *Lebanese Science Journal* 13 (2): 81-97.
- Kessmann H. & Barz W.** (1986). Elicitation and suppression of phytoalexin and isoflavone accumulation in cotyledons of *Cicer arietinum* L. as caused by wounding and by polymeric components from the fungus *Ascochyta rabiei*. *Journal of Phytopathology* 117: 321–325.
- Khan M.S.A., Ramsey M.D., Corbiere R., Infantino A., Porta-Puglia A., Bouznad Z. & Scott E.S.** (1999). *Ascochyta* blight of chickpeas in Australia: identification, pathogenicity and mating type. *Plant Pathology* 48: 230–234.
- Khan T.N., Timmerman-Vaughan G.M., Rubiales D., Warkentin T.D., Siddique K.H.M., Erskine W., Barbetti M.J.** (2013). *Didymella pinodes* and its management in field pea: Challenges and opportunities. *Field Crops Research* 148: 61–77.
- Khan Z.S. & Nasreen S.** (2010). Phytochemical analysis, antifungal activity and mode of action of methanol extracts from plants against pathogens. *Journal of Agricultural Technology* 6 (4): 793-805.
- Khani M., Davidson J.A., Sosnowski M.R. & Scott E.S.** (2016). Survival of *Phoma koolunga*, a causal agent of *ascochyta* blight, on field pea stubble or as pseudosclerotia in soil. *Plant Pathology* 65 (8): 1246-1253.
- Kharrat M., Le Guen J. & Tivoli B.** (2006). Genetics of resistance to 3 isolates of *Ascochyta fabae* on Faba bean (*Vicia faba* L.) in controlled conditions. *Euphytica* 151: 49–61.
- Khirbat S.K. & Jalali B.L.** (1997). Physiological changes in chickpea due to *Ascochyta* blight inoculation. *Annals of Agricultural and Biological Research* 2: 133–136.

- Khirbat S.K. & Jalali B.L.** (1999). Biochemical basis of resistance to chickpea *Ascochyta* blight. *Legume Research* 22: 46–50.
- Kiba A., Toyoda K., Ichinose Y., Yamada T. & Shiraishi T.** (1996). Species specific suppression of superoxide-anion generation on surfaces of pea leaves by the suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 62: 508–512.
- Kim W., Peever T.L., Park J-J., Park C-M., Gang D.R., Xian M., Davidson J. A., Infantino A., Kaiser W.J. & Chen W.** (2016). Use of metabolomics for the chemotaxonomy of legume associated *Ascochyta* and allied genera. *Scientific Reports* 6 (20192): 1-12.
- Köchler G., Linkert C. & Barz W.** (1995). Infection studies of *Cicer arietinum* (L.) with GUS-(*E. coli*  $\beta$ -glucuronidase) transformed *Ascochyta rabiei* strains. *J. Phytopathol.* 143: 589–595.
- Kohpina S., Knight R. & Stoddard F.L.** (1999). Variability of *Ascochyta fabae* in South Australia. *Aust. J. Agric. Res.* 50: 1475–1481.
- Kole C.** (2007). Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Vol. 3: Pulses, Sugar and Tuber Crops. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.* 321p.
- Koul O. & Dhaliwal G.S.** (2001). Advances in biopesticide research, Vol I: Phytochemical biopesticides. *Harwood Academic Publishers gmbh, Amsterdam.* 190p.
- Koul O. & Walia S.** (2009). Comparing impacts of plant extracts and pure allelochemicals and implications for pest control. *Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 4 (49): 1–30.
- Kraft J.M., Larsen R.C. & Inglis D.A.** (1998) Diseases of pea. pp. 325-370; *in*: The pathology of food and pasture legumes. Allen D.J. & Lenné J.M. *CAB International, Wallingford, UK & ICRISAT, Andhra Pradesh, India.*
- Küçük Ç., Kivanç M., Kinaci E. & Kinaci G.** (2007). Efficacy of *Trichoderma harzianum* (Rifaii) on inhibition of *ascochyta* blight disease of chickpea. *Annals of Microbiology* 57 (4): 665-668.
- Kusumoto N., Zhao T., Swedjemark G., Ashitani T., Takahashi K. & Borg-Karlson A-K.** (2014). Antifungal properties of terpenoids in *Picea abies* against *Heterobasidion parviporum*. *Forest Pathology* 44: 353–361.
- Labdi M., Malhotra R., Benzohra I.E. & Imtiaz M.** (2013). Inheritance of resistance to *Ascochyta rabiei* in 15 chickpea germplasm accessions. *Plant Breeding* 132, 197–199.

- Lai F-M., DeLong C., Mei K., Wignes T. & Fobert P.R.** (2002). Analysis of the DRR230 family of pea defensins: gene expression pattern and evidence of broad host-range antifungal activity. *Plant Science* 163: 855-864.
- Laloi G., Montarry J., Guibert M., Andrivon D., Michot D., Le May C.** (2016). Aggressiveness changes in populations of *Didymella pinodes* over winter and spring pea cropping seasons. *Applied and Environmental Microbiology* 82 (14): 4330–4339.
- Landy & Le Bot** (1958). La culture des petits Pois dans les pays nantais. *Agric. Pratique*.
- Latif Z., Shahid A.A. & Riazuddin S.** (1998). Production of phytotoxins in chickpea plants infected with *Ascochyta rabiei*. *Pakistan Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 31:48–60.
- Latif Z., Strange R.N., Bilton J. & Riazuddin S.** (1993). Production of the phytotoxins, solanapyrones A and C and Cytochalasin D among nine isolates of *Ascochyta rabiei*. *Plant Pathology* 42: 72–80.
- Lattanzio V.** (2013). Phenolic Compounds. pp 1543-1580. *in*: Natural Products. Ramawat K.G. & Mérillon J.M. (eds). *Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany*.
- Lattanzio V., De Cicco V., Di Venere D., Lima G. et Salerno M.** (1994). Antifungal activity of phenolics against fungi commonly encountered during storage. *Italian Journal of Food Science* 1: 23-30.
- Le May C., Guibert M., Baranger A. & Tivoli B.** (2014). A wide range of cultivated legume species act as alternative hosts for the pea aschochyta blight fungus, *Didymella pinodes*. *Plant Pathology* 63: 877–887.
- Le May C., Guibert M., Leclerc A., Andrivon D., Tivoli B.** (2012). A single, plastic population of *Mycosphaerella pinodes* causes ascochyta blight on winter and spring peas (*Pisum sativum*) in France. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (23): 8431–8440.
- Le May C., Potage G., Andrivon D., Tivoli B. & Outreman Y.** (2009). Plant Disease Complex: Antagonism and Synergism Between Pathogens of the *Ascochyta* Blight Complex on Pea. *Journal of Phytopathology* 157: 715–721.
- Lee J.Y., Lee Jung Y., Yun B-S. & Hwang B.K.** (2004). Antifungal Activity of  $\beta$ -Asarone from Rhizomes of *Acorus gramineus*. *J. Agric. Food Chem.* 52: 776-780.
- Lepoivre P.** (1982) Sensitivity of pea cultivars to ascochitine and the possible role of the toxin in the pathogenicity of *Ascochyta pisi* (Lib.). *Phytopathologische Zeitschrift* 103: 25–34.

- Lepoivre P.** (2003). *Phytopathologie, Bases moléculaires et biologiques des pathosystème et fondements des stratégies de lutte.* Presses Agronomiques de Gembloux.
- Leybros J. Frémeaux P.** (1990). *Extraction solide-liquide. Techniques et appareillage. Techniques de l'ingénieur, J2782 v1 France.*
- Li H., Rodda M., Gnanasambandam A., Aftab M., Redden R., Hobson K., Rosewarne G., Materne M., Kaur S. & Slater A.T.** (2015). Breeding for biotic stress resistance in chickpea: progress and prospects. *Euphytica* 204 (2): 257-288.
- Li Y., Ruperao P., Batley J., Edwards D., Davidson J.A., Hobson K. & Sutton T.** (2017) Genome Analysis Identified Novel Candidate Genes for Ascochyta Blight Resistance in Chickpea Using Whole Genome Re-sequencing Data. *Front. Plant Sci.* 8 (359): 1–13.
- Li Y.P., You M., Finnegan P., Khan T., Lanoiselet V., Eyres N. & Barbetti M.J.** (2012). First report of black spot caused by *Boerema exigua* var. *exigua* on field pea in Australia. *Plant Disease* 96: 148–149.
- Li Y.P., You M., Khan T., Finnegan P., & Barbetti M.J.** (2011). First report of *Phoma herbarum* on field pea (*Pisum sativum*) in Australia. *Plant Disease* 95: 1590–1590.
- Linthorst H.J.M.** (1991) Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 10: 123-150.
- Liu J., Cao T., Feng J., Chang K-F., Hwang S-F. & Strelkov S.E.** (2013). Characterization of the fungi associated with ascochyta blight of field pea in Alberta, Canada. *Crop Protection* 54: 55-64.
- Liu N., Xu S., Yao X., Zhang G., Mao W., Hu Q., Feng Z. & Gong Y.** (2016). Studies on the Control of Ascochyta Blight in Field Peas (*Pisum sativum* L.) Caused by *Ascochyta pinodes* in Zhejiang Province, China. *Frontiers in Microbiology* 7 (481): 1-13.
- Luckner M.** (1984). *Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants, and Animals.* Second Edition. *Springer-Verlag Berlin Beideiberg GmbH.*
- Macheix J-J., Fleuriet A. & Jay-Allemand C.** (2005). *Les Composés Phénoliques des Végétaux, Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique.* *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes.*

- Madar Z., Gottlieb H.E., Cojocar M., Riov J., Solel Z. & Sztejnberg A. (1995).** Antifungal Terpenoids Produced by Cypress After Infection by *Diplodia pinea* f. sp. cupressi. *Phytochemistry* 38 (2): 351-354.
- Madden L.V., Hughes G. & Van Den Bosch F. (2007).** The Study of Plant Disease Epidemics. *APS Press, St Paul, MN, USA*. 421p.
- Madeira A.C., Fryett K. P., Rossall S. & Clark J. A. (1993).** Interaction between *Ascochyta fabae* and *Botrytis fabae*. *Mycol. Res.* 97 (10): 1217-1222.
- Mahiout D., Bendahmane B.S., Benkada M.Y. & Rickauer M. (2015).** Physiological Characterisation of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. Isolated from Diseased Chickpea Fields in Six Regions of North western Algeria. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 15 (6): 1136-1146.
- Mahlo S.M., McGaw L.J. & Eloff J.N. (2010).** Antifungal activity of leaf extracts from South African trees against plant pathogens. *Crop Protection* 29: 1529-1533.
- Mahmoudian M., Jalilpour H. & Salehian P. (2002).** Toxicity of *Peganum harmala*: review and a case report. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics* 1 (1):1-4.
- Mannion A.M. (1999).** Domestication and the origins of agriculture: an appraisal, *Progress in Physical Geography* 23: 37-56.
- Mantri N.L., Ford R., Coram T.E., Pang E.C.K. (2010).** Evidence of unique and shared responses to major biotic and abiotic stresses in chickpea. *Environmental and Experimental Botany* 69 (2010) 286-292.
- Marley P.S., Diourte M., Neya A. & Rattunde F.W. (2005).** Sorghum anthracnose and sustainable management strategies in West and Central Africa. *Journal of Sustainable Agriculture*, vol. 245 (1): 43-56.
- Marston A. & Hostettmann K. (2006).** Separation and Quantification of Flavonoids. Pp 1-36. In: *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Andersen Ø.M. & Markham K.R. (eds). *Taylor & Francis Group, LLC*.
- Masangwa J.I.G., Aveling A.S., Kritzing Q. (2013).** Screening of plant extracts for antifungal activities against *Colletotrichum* species of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). *Journal of Agricultural Science* 151: 482-491.
- Mauch F., Hadwiger L.A. & Boiler T. (1988a).** Antifungal hydrolases in pea tissue. I. Purification and characterization of two chitinases and two  $\beta$ -1,3-glucanases

- differentially regulated during development and in response to fungal infection. *Plant Physiology* 87: 325-333.
- Mauch F., Hadwiger L.A. & Boiler T.** (1988b). Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combination of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanases. *Plant Physiology* 88: 936-942.
- Maude R.B., Bambridge J.M. & Spencer A.** (1986a). Tests of fungicide seed treatments to eliminate seed-borne *Ascochyta pisi* (leaf and pod spot of peas). *Annals of Applied Biology* 108: 70–71.
- Maude R.B., Presly A.H. & Lovett J.F.** (1986b). Demonstration of the adherence of thiram to pea seeds using a rapid method of spectrophotometric analysis. *Seed Science and Technology* 14: 361–369.
- Maurin N. & Tivoli B.** (1992). Variation in the resistance of *Vicia faba* to *Ascochyta fabae* in relation to disease development in field trials. *Plant Pathology* 41: 737–744.
- McDonald G.K., & Peck D.** (2009). Effects of crop rotation, residue retention and sowing time on the incidence and survival of ascochyta blight and its effect on grain yield of field peas (*Pisum sativum* L.). *Field Crops Research* 111: 11-21.
- McMurray L.S., Brand J., Davidson J.A., Hobson K. & Materne M.** (2006). Economic chickpea production for southern Australia through improved cultivars and strategic management to control ascochyta blight. p. 65. *in*: Proceedings of 13th Australian Agronomy Conference, 10–15 September, Perth, Western Australia.
- McMurray L.S., Davidson J.A. Lines M.D., Leonforte A. & Salam M.U.** (2011). Combining management and breeding advances to improve field pea (*Pisum sativum* L.) grain yields under changing climatic conditions in south-eastern Australia. *Euphytica* 180: 69–88.
- Mellersh D.G. & Heath M.C.** (2004). Cellular Expression of Resistance to Fungal Plant Pathogens. pp 1-56. *in*: Fungal Disease Resistance in Plants. *Biochemistry, Molecular Biology, and Genetic Engineering*. Punja Z.K. (ed). *The Haworth Press, Inc.*
- Messiaen C.-M., Blancard D., Rouxel F. & Lafon R.** (1991). Les Maladies des Plantes Maraichères. 3<sup>ème</sup> Edition. *INRA, Paris, France*. 552 p.
- Ministère de l'agriculture.** Statistiques agricoles, Période 2000-2016. Ministère de l'Agriculture, de Développement Rural et de la Pêche. *Non publié.*
- Miresmailli S., Isman M.B.** (2014). Botanical insecticides inspired by plant–herbivore chemical interactions. *Trends Plant Sciences* 19 (1): 29–35.

- Miyamae Y., Villareal M.O., Abdrabbah M.B., Isoda H. & Shigemori H.** (2009). Hirseins A and B, daphnane diterpenoids from *Thymelaea hirsuta* that inhibit melanogenesis in B16 melanoma cells. *Journal of Natural Products* 72: 938-941.
- Mogensen E.G., Challen M.P. & Strange R.N.** (2006). Reduction in solanapyrone phytotoxin production by *Ascochyta rabiei* transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiol Lett* 255: 255–261.
- Molot P.M.** (1979). Recherches sur la Résistance du Maïs à l'Helminthosporiose et au Fusariose. III- Mode d'Action des Composés Phénoliques. *Annales de Phytopathologie* Vol.1 N° 3: 367-383.
- Mondal S. N., Bhatia A., Shilts T., & Timmer L. W.** (2005). Baseline Sensitivities of Fungal Pathogens of Fruit and Foliage of Citrus to Azoxystrobin, Pyraclostrobin, and Fenbuconazole. *Plant Disease* 89 (11): 1186-1194.
- Monti L., Biddle A.J., Moreno M. T. & Plancquaert P.** (1994). Biotic and abiotic stresses of pulse crops in Europe. pp 204-218 in: *Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes*. Muehlbauer F. J. and W. J. Kaiser, eds. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Morgan-Jones G. & Burch K.B.** (1987). Studies in the genus *Phoma*. VIII. Concerning *Phoma pinodella*. *Mycotaxon* 29: 477-487.
- Moussart A., Onfroy C., Lesne A., Esquibet M., Grenier E. & Tivoli B.** (2007). Host status and reaction of *Medicago truncatula* accessions to infection by three major pathogens of pea (*Pisum sativum*) and alfalfa (*Medicago sativa*). *European Journal of Plant Pathology* 117: 57–69.
- Moussart A., Tivoli B., Lemarchand E., Deneufbourg F., Roi S. & Sicard G.** (1998). Rôle of seed infection by the ascochyta blight of dried pea (*Mycosphaerella pinodes*) in seedling emergences, early disease development and transmission of the disease to aerial plant part. *European Journal of Plant Pathology* 104: 93-102.
- Muehlbauer F.J. & Chen W.** (2007). Resistance to ascochyta blights of cool season food legumes. *Eur J Plant Pathol* 119:135–141.
- Murugan R., Parimelazhagan T.** (2014). Comparative evaluation of different extraction methods for antioxidant and anti-inflammatory properties from *Osbeckia parvifolia* Arn. – An in vitro approach. *Journal of King Saud University – Science* 26: 267–275.
- Muthaiyan M.C.** (2009). Principles and Practices of Plant Quarantine. pp 105-107. *Allied Publishers Pvt. Ltd.* New Delhi, India.

- Nagegowda D.A. & Dudareva N.** (2007). Plant Biochemistry and Biotechnology of Flavor Compounds and Essential Oils. pp 469-492. *in: Medicinal Plant Biotechnology.* Kayser O. & Quax W.J. (eds). *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim, Germany.*
- Najjaa H., Ben Arfa A., Máthé Á., & Neffati M.** (2017). Aromatic and Medicinal Plants of Tunisian Arid and Desert Zone Used in Traditional Medicine, for Drug Discovery and Biotechnological Applications. pp 157-230. *in: Medicinal and Aromatic Plants of the World – Africa (Vol. 3).* Neffati M., Najjaa H. & Máthé Á. (eds). *Springer Science+Business Media B.V.*
- Nascimento N.C.d. & Fett-Neto A.G.** (2016). Plant Secondary Metabolism and Challenges in Modifying its Operation: An Overview. pp 1-14. *in: Biotechnology of Plant Secondary Metabolism, Methods and Protocols.* Fett-Neto A.G. (ed) *Springer Science, New York, USA.*
- Nasir M., Hoppe H.H. & Ebrahim-Nesbat F.** (1992) The development of different pathotype groups of *Mycosphaerella pinodes* in susceptible and partially resistant pea leaves. *Plant Pathology* 41, 187-194.
- Navas-Cortés J.A., Trapero-Casas A. & Jiménez-Díaz R.M.** (1998). Influence of relative humidity and temperature on development of *Didymella rabiei* on chickpea debris. *Plant Pathology* 47: 57–66.
- Navas-Cortés J.A., Trapero-Casas A. & Jiménez-Díaz, R.M.** (1995). Survival of *Didymella rabiei* in chickpea straw debris in Spain. *Plant Pathology* 44: 332–339.
- Nawaz H.R., Malik A. & Ali M.S.** (2001). Trianthenol: an antifungal tetraterpenoid from *Trianthema portulacastrum* (Aizoaceae). *Phytochemistry* 56: 99-102.
- Nehra K.S. Chugh L.K. Dhillon S. & Singh R.** (1994). Induction, purification and characterization of chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.) leaves and pods infected with *Ascochyta rabiei*. *Journal of Plant Physiology* 144: 7–11.
- Nene Y. L.** (1982). A Review of *Ascochyta* Blight of Chickpea. *Tropical Pest Management* 28(1): 61-70.
- Nene Y.L. & Reddy M.V.** (1987). Chickpea diseases and their control. pp 233–270. *in: The chickpea.* Saxena M.K., Singh K.B. & Johansen C. (eds). *CAB International: Oxon, UK.*
- Nene Y.L., Haware M.P. & Reddy M.V.** (1981). Chickpea diseases: resistance-screening techniques. Information Bulletin N° 10. *International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), India.*

- Nene Y.L., Sheila Y.K. & Sharma S.B.** (1996). A world list of chickpea and pigeonpea pathogens. *ICRISAT Pulse Pathology Progress Report*.
- Noman L., Oke-Altuntas F., Zellagui A., Demirtas I., & Rhouati S.** (2018). Isochamaejasmin and other Flavonoids Isolated from an Endemic Algerian Desert Species. *Journal of the Turkish Chemical Society* 5 (2): 347-354.
- O'Callaghan, K.J., Stone, P.J., Hu, X., Griffiths, D.W., Davey, M.R. and Cocking, E.C.** (2000). Effects of glucosinolates and flavonoids on colonization of the roost of *Brassica napus* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2185–2191.
- Ogle H.J.** (1997). Disease management: chemicals. pp 373–389. *in*: Plant pathogens and plant diseases. Brown J.F. & Ogle H.J. (eds). *Rockvale Publications*.
- Onfroy C. & Tivoli B.** (2005). Test de Criblage du Pois Proteagineux au Stade Juvenile pour la Resistance au Pathogene Fongique *Mycosphaerella pinodes*. *Cahier des Techniques Numéro spécial* : 123-126.
- Onfroy C., Baranger A. & Tivoli B.** (2007). Biotic factors affecting the expression of partial resistance in pea to ascochyta blight in a detached stipule assay. *Eur J Plant Pathol.* 119: 13–27.
- Onfroy C., Tivoli B., Corbière R. & Bouznad Z.** (1999). Cultural, molecular and pathogenic variability of *Mycosphaerella pinodes* and *Phoma medicaginis* var. *pinodella* isolates from dried pea (*Pisum sativum*) in France. *Plant Pathology* 48: 218–229.
- Oros G. & Ujváry I.** (1999). Botanical fungicides: natural and semi-synthetic ceveratum alkaloids. *Pesticide Science* 55: 253-264.
- Osborn A.E.** (1996). Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *The Plant Cell* 8: 1821-1831.
- Ozenda P.** (2004). Flore et végétation du Sahara. Troisième Edition, *CNRS Edition, Paris, France*. 662 p.
- Ozkilinc H., Thomas K., Abang M. & Peever T.L.** (2015). Population structure and reproductive mode of *Didymella fabae* in Syria. *Plant Pathology* 64: 1110–1119.
- Ozkilinc H., Frenkel O., Abbo S., Eshed R., Sherman A., Shtienberg D., Ophir R. & Can C.** (2010). A comparative study of Turkish and Israeli populations of *Didymella rabiei*, the ascochyta blight pathogen of chickpea. *Plant Pathology* 59: 492-503.

- Pande S., Sharma M., Gaur P.M. & Gowda C.L.L.** (2010). Host Plant Resistance to Ascochyta Blight of Chickpea. Information Bulletin No. 82. *International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT). India.* 40 pp.
- Pande S., Sharma M., Kumari S., Gaur P.M., Chen W., Kaur L., MacLeod W., Basandrai A., Basandrai D., Bakr A., Sandhu J.S., Tripathi H.S. & Gowda C.L.L.** (2009). Integrated foliar diseases management of legumes. *International Conference on Grain Legumes: Quality Improvement, Value Addition and Trade, February 14-16, 2009*, Indian Society of Pulses Research and Development, Indian Institute of Pulses Research, Kanpur, India.
- Pande S., Siddique K.H.M., Kishore G. K., Bayaa B., Gaur P.M., Gowda C. L. L., Bretag T. W., & Crouch J. H.** (2005). Ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review of biology, pathogenicity, and disease management. *Australian Journal of Agricultural Research* 56: 317–332.
- Pandey B.K. Singh U.S. & Chaube H.S.** (1987). Mode of infection of ascochyta blight as caused by *Ascochyta rabiei*. *J. Phytopathol.* 119: 88–93.
- Pandey M.K., Pandey R., Singh V.P., Pandey V.B. & Singh U.P.** (2002). Antifungal activity of 4',7-dimethoxyisoflavone against some fungi. *Mycobiology* 30: 55-56.
- Pataky J.K. & Carson M.L.** (2004). Host Resistance. pp 500-528. *in: Plant Pathology, Concepts and Laboratory Exercises.* Trigiano R.N., Windham M.T & Windham A.S. (eds). *CRC Press LLC.*
- Pedersen E.A. & Morrall R.A.A.** (1995). Effect of wind speed and direction on horizontal spread of ascochyta blight of lentil. *Canadian Journal of Plant Pathology* 17: 223-232.
- Peever T.L.** (2007). Role of host specificity in the speciation of *Ascochyta* pathogens of cool season food legumes. *European Journal of Plant Pathology*, 119: 119–126.
- Peever T.L., Barve M.P., L.J. Stone & Kaiser W.J.** (2007). Evolutionary relationships among *Ascochyta* species infecting wild and cultivated hosts in the legume tribes Cicereae and Viciae. *Mycologia* 99(1): 59–77.
- Peever T.L., Chen W., Abdo Z. & Kaiser W.J.** (2012). Genetics of virulence in *Ascochyta rabiei*. *Plant Pathology* 61: 754–760.
- Peever T.L., Salimath S., Su G., Kaiser J.W. & Muehlbauer F.J.** (2004). Historical and contemporary multilocus population structure of *Ascochyta rabiei* (teleomorph *Didymella rabiei*) in the Pacific Northwest of the United States. *Molecular Ecology* 13: 291-309.

- Persson L., Bødker L. & Larsson-Wikström, M.** (1997). Prevalence and pathogenicity of foot and root rot pathogens of pea in southern Scandinavia. *Plant Disease* 81: 171–174.
- Porta-Puglia A.** (1990). Status of *Ascochyta rabiei* of chickpea in the Mediterranean basin. *Options Méditerranéennes* N° 9: 51-54.
- Pretorius J.C. & Van Der Watt E.** (2011). Natural Products from Plants: Commercial Prospects in Terms of Antimicrobial, Herbicidal and Bio-stimulatory Activities in an Integrated Pest Management System. pp 42-90. *in*: Natural Products in Plant Pest Management. Dubey N.K (ed). *CAB International*.
- Pretorius J.C., Craven P. & Van Der Watt E.** (2002). In vivo control of *Mycosphaerella pinodes* on pea by a crud bulb extract of *Eucomis autumnalis*. *Annals of Applied Biology* 141: 125-131.
- Purkayastha R.P.** (1996). Phytoalexin production and plant defense. *Proc. Indian nat. Sci. Acad.* B62 N° 1: 51-64.
- Purugganan M.D. & Fuller D.Q.** (2009). The nature of selection during plant domestication. *Nature* 457: 843-848.
- Raja N.** (2014). Botanicals: sources for eco-friendly biopesticides. *J Biofertil Biopestici* 5:1.
- Rapilly F.** (1968). Les Techniques de Mycologie en Pathologie Végétale. *INRA, Paris, France*. 102 p.
- Rasoamiaranjanahary L., Marston A., Guilet D., Schenk K., Randimbivololona F. & Hostettmann. K.** (2003). Antifungal diterpenes from *Hypoestes serpens* (Acanthaceae). *Phytochemistry* 62: 333–337.
- Rasool S., Abdel Latef A. A. H. & Ahmad P.** (2015). Chickpea: Role and responses under abiotic and biotic stress. pp 67-79 *in*: Legumes Under Environmental Stress: Yield, Improvement and Adaptations. Azooz M.M. & Ahmad P. (eds). *John Wiley & Sons Ltd*.
- Redden R., Paull J., Zong X., Sass O., Yang T. & Ling L.** (2014) pp: 75-95 *in*: Broadening the Genetic Base of Grain Legumes. Singh M., Bisht I.S. & Dutta M. (eds). *Springer Science*.
- Reddy M.V. & Singh K.B.** (1990). Relationship between temperature, relative humidity and *Ascochyta* blight development in winter-sown Chickpea in Syria. *Phytopathologia Mediterranea* 29 (3): pp. 159-162.

- Regnault-Roger C. & Philogene B.J.R.** (2008). Past and current prospects for the use of botanicals and plant allelochemicals in Integrated Pest Management. *Pharmaceutical Biology* 46: 41–52.
- Rémond D. & Walrand S.** (2017). Les graines de légumineuses : caractéristiques nutritionnelles et effets sur la santé. *Innovations Agronomiques* 60: 133-144.
- Rhaïem A., Cherif M., Kharrat M., Cherif M. & Harrabi M.** (2002). New faba bean genotypes resistant to chocolate spot caused by *Botrytis fabae*. *Phytopathol. Mediterr.*41: 99–108.
- Richard C. & Boivin G.** (1994). Maladies et Ravageurs des Cultures Légumières au Canada. La Société Canadienne de Phytopathologie et la Société d'entomologie du Canada. pp : 223-246.
- Rodda MS., Davidson J.A., Javid M., Sudheesh S., Blake S., Forster JW. & Kaur S.** (2017) Molecular Breeding for Ascochyta Blight Resistance in Lentil: Current Progress and Future Directions. *Front. Plant Sci.* 8 (1136): 1-11.
- Roger C. & Tivoli B.** (1996). Spatio-temporal development of pycnidia and perithecia and dissemination of spores of *Mycosphaerella pinodes* on pea (*Pisum sativum*). *Plant Pathology* 45: 518–528.
- Roger C., Tivoli B. & Huber L.** (1999a). Effects of temperature and moisture on disease and fruit body development of *Mycosphaerella pinodes* on pea (*Pisum sativum*). *Plant Pathology* 48: 1–9.
- Roger C., Tivoli B. & Lemarchand E.** (1998). L'antracnose du pois protéagineux, comprendre le développement épidémique pour mieux maîtriser la maladie. *Phytoma, la défense des végétaux* 509 : 2-11.
- Roger C., Tivoli B., & Huber L.** (1999b). Effects of interrupted wet periods and different temperatures on the development of ascochyta blight caused by *Mycosphaerella pinodes* on pea (*Pisum sativum*) seedlings. *Plant Pathology* 48: 10-18.
- Roy S. & Chatterjee P.** (2010). A non-toxic antifungal compound from the leaves of *Catharanthus roseus* characterized as 5-hydroxy flavone by UV spectroscopic analysis and evaluation of its antifungal property by agar-cup method. *Industrial Crops and Products* 32: 375–380.
- Rubiales D. & Fondevilla S.** (2012). Future prospects for ascochyta blight resistance breeding in cool season food legumes. *Front. Plant Sci.* 3 (27): 1-5.
- Rubiales D. Trapero-Casas A.** (2002). Occurrence of *Didymella fabae*, the teleomorph of *Ascochyta fabae*, on faba bean straw in Spain. *Journal of Phytopathology* 150: 146-148.

- Rubiales D., Fondevilla S., Chen W. & Davidson J.A.** (2018). Editorial: Advances in Ascochyta Research. *Front. Plant Sci.* 9 (22): 1-3.
- Rubiales D., Fondevilla S., Chen W., Gentzbittel L., Higgins T.J.V., Castillejo M.A., Singh K.B., & Rispaïl N.** (2014). Achievements and Challenges in Legume Breeding for Pest and Disease Resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences* 34: 195–236.
- Ruiz J.M. & Romero L.** (2001). Bioactivity of the Phenolic Compounds in Higher Plants. pp 651-681. *in: Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 2.* Atta-ur-Rahman (ed). *Elsevier Science B.V.*
- Saeed M.F., Baćanovic J., Bruns C., Schmidt H. & Finckh M.R.** (2017). Seed health of organic peas and faba beans and its effects on the health of the harvested grains. *Journal of Plant Diseases and Protection.* 124 (4): 331-337.
- Sahni S., Maurya S., Singh U.P., Singh A.K., Singh V.P. & Pandey V.B.** (2005). Antifungal activity of nor-securinine against some phytopathogenic fungi. *Mycobiology* 33: 97-103.
- Salamini F., Özkan H., Brandolini A., Schäfer-Pregl R. & Martin W.** (2002). Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nature Reviews Genetics* 3: 429 – 440.
- Sales M.D.C., Costa H.B., Fernandes P.M.B., Ventura J.A. & Meira D.D.** (2016). Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6 (1): 26-31.
- Salomone A., Scaritto G., Sacco A., Cabras G., Angioni A.** (2008) Inhibitory effects of the main compounds of oregano essential oil against some pathogenic fungi. Modern fungicide and Antifungal compounds. *Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft* 44: 345–360.
- Sánchez-Pujante P.J., Borja-Martínez M., Pedreño M.Á. & Almagro L.** (2017). Biosynthesis and bioactivity of glucosinolates and their production in plant in vitro cultures. *Planta* 246 (1): 19-32.
- Sari E., Bhadauria V., Ramsay L., Borhan M.H., Lichtenzweig J., Bett K.E., Vandenberg A. & Banniza S.** (2018). Defense responses of lentil (*Lens culinaris*) genotypes carrying non-allelic ascochyta blight resistance genes to *Ascochyta lentis* infection. *PLoS ONE* 13 (9: e0204124): 1-27.
- Sari E., Bhadauria V., Vandenberg A. & Banniza S.** (2017) Genotype-Dependent Interaction of Lentil Lines with *Ascochyta lentis*. *Front. Plant Sci.* 8 (764): 1-13.

- Sarker S.D., Latif Z. & Gray A.I.** (2006). Natural Product Isolation, an Overview. pp 1-25. *in*: Natural Products Isolation, Second Edition. Sarker S.D., Latif Z. & Gray A.I. (eds). *Humana Press Inc. New Jersey, USA*.
- Sarwar M., Jamil F.F. & Baig N.A.** (1996). Response of four chickpea varieties against *Ascochyta* blight and their histological studies. *Pakistan Journal of Botany* 28: 213–217.
- Sekour M., Souttou K., Beddiaf R., Djilali K., Kermadi S., Guezou L. O., Ababsa L. & Doumandji S.** (2015). Place de la Merione de SHAW dans le Menu Trophique de la Chouette Effraie *Tyto alba* (Scopoli, 1759) dans la Pineraie de la Reserve Naturelle de MergueB. *Actes du Séminaire International sur la Biodiversité Faunistique en Zones Arides et Semi-arides*.
- Scherf A.** (2011). Licorice, cucumber, downy mildew: tracing the secret. Interactions between the plant extract, the host and the pathogen. *Dissertation eines Doctor rerum naturalium. Technischen Universität Darmstadt. Deutschland*.
- Scherf A., Schuster C., Marx P., Gärber U., Konstantinidou-doltsinis S. & Schmitt A.** (2010). Control of downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) of greenhouse grown cucumbers with alternative biological agents. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 75: 541-555.
- Scherf A., Treutwein J., Kleeberg H. & Schmitt A.** (2012). Efficacy of leaf extract fractions of *Glycyrrhiza glabra* L. against downy mildew of cucumber (*Pseudoperonospora cubensis*). *European Journal of Plant Pathology* 134: 755-762.
- Schneider A., Huyghe C., Maleplate T., Labalette F., Peyronnet C. & Carrouée B.** (2015). Rôle des légumineuses dans l'agriculture française. pp11-76. *in*: Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables. Schneider A. & Huyghe C. (eds). *Editions Quæ. Versailles, France*.
- Schoeny A., Jumel S., Rouault F., Le May C. & Tivoli B.** (2007). Assessment of airborne primary inoculum availability and modelling of disease onset of *ascochyta* blight in field peas. *European Journal of Plant Pathology* 119: 87-97.
- Schoeny A., Menat J., Darsonval A., Rouault F., Jumel S. & Tivoli B.** (2008). Effect of pea canopy architecture on splash dispersal of *Mycosphaerella pinodes* conidia. *Plant Pathology* 57 : 1073–1085.
- Scott P. R. & Hollins T. W.** (1974). Effects of eyespot on the yield of winter wheat. *Annals of Applied Biology* 78: 269-279.

- Seidel V.** (2006). Initial and Bulk Extraction. pp 27-46. *in: Methods in Biotechnology*, Vol. 20, Natural Products Isolation, 2<sup>nd</sup> edition. Sarker S.D., Latif Z., & Gray A.I. *Humana Press Inc. New Jersey, USA.*
- Sergeeva V.** (2015). Medicinal Plants to Control Diseases and Pests. pp 257-271. *in: Medicinal and Aromatic Plants of the World*. Vol. 1. Mâthé Á. (ed). *Springer Dordrecht Heidelberg, Germany.*
- Şesan T.E., Enache E., Iacomi B.M., Oprea M., Oancea F., Iacomi C.** (2015). Antifungal Activity of Some Plant Extracts Against *Botrytis cinerea* Pers. in the Blackcurrant Crop (*Ribes nigrum* L.). *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus* 14(1): 29-43.
- Setti B., Bencheikh M., Henni J. & Neema C.** (2009). Comparative aggressiveness of *Mycosphaerella pinodes* on peas from different regions in western Algeria. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 195–204.
- Shahid A. A., Husnain T. & Riazuddin S.** (2008). Ascochyta blight of chickpea: Production of phytotoxins and disease management. *Biotechnology Advances* 26 : 511–515.
- Shaner G. & Finney R. E.** (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67: 1051-1056.
- Sheetal V. & Singh S.P.** (2008). Current and future status of herbal medicines. *Veterinary World* 1 (11): 347–350.
- Shiraishi T., Ouchi S. & Oku H.** (1983). Regulation of resistance expression in *Pisum sativum* by elicitor and suppressor of *Mycosphaerella pinodes*. p. 194. *in: 4<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology*. Melbourne, Australia.
- Shtienberg D., Kimber R.B.E., McMurray L., & Davidson J.A.** (2006). Optimisation of the chemical control of ascochyta blight in chickpea. *Australasian Plant Pathology* 35: 715–724.
- Sillero J. C., Avila C. M., Moreno M. T. & Rubiales D.** (2001). Identification of resistance to *Ascochyta fabae* in *Vicia faba* germplasm. *Plant Breeding* 120: 529-531.
- Sillero J. C., Rojas-Molina M. M., Avila C. M. & Rubiales D.** (2012). Induction of systemic acquired resistance against rust, ascochyta blight and broomrape in faba bean by exogenous application of salicylic acid and benzothiadiazole. *Crop Protection* 34: 65-69.

- Sillero J. C., Villegas-Fernández A. M., Thomas J., Rojas-Molina M. M., Emeran A. A., Fernández-Aparicio M. & Rubiales D.** (2010). Faba bean breeding for disease resistance. *Field Crops Research* 115: 297–307.
- Sindhu A. Singh R. Nehra K.S. & Singal H.R.** (1995). Elicitor-induced metabolic changes in seedlings of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in relation to *Ascochyta bligh*. *Annals of Biology* 11: 183–187.
- Singh A.K., Pandey M.B. & Singh U.P.** (2007). Antifungal Activity of an Alkaloid Allosecurinine against Some Fungi. *Mycobiology* 35(2): 62-64.
- Singh G., Kaur P., Kumar A., Verma M.M., Kaur L. & Sharma Y.R.** (1995). Primary and secondary spread of *Ascochyta* blight of gram. pp 65–69. *in*: Integrated disease management and plant health. Gupta V.K., Sharma R.C. & Johansen C. (eds). Scientific Publishers: Jodhpur, India.
- Singh K.B. & Ocampo B.** (1997). Exploitation of wild *Cicer* species for yield improvement in chickpea. *Theoretical Applied Genetics* 95: 418-423.
- Singh K.B., Hawtin G.C., Nene Y.L. & Reddy M.V.** (1981). Resistance in chickpeas to *Ascochyta rabiei*. *Plant Disease* 65: 586-587.
- Singh N.P., Singh A. & Asthana A.N.** (1999). Studies on inter-specific crossability barriers in chickpea. *Indian Journal of Pulse Research* 12: 13-19.
- Singh S., Singh I., Kapoor K., Gaur P.M., Chaturvedi S. K., Singh N.P. & Sandhu J.S.** (2014) pp: 51-74 *in*: Broadening the Genetic Base of Grain Legumes. Singh M., Bisht I.S. & Dutta M. (eds). *Springer Science*.
- Sirirat S., Wimolpun R. & Sanit S.** (2009). Antifungal activity of essential oils derived from some medicinal plants against grey mould (*Botrytis cinerea*). *Asian Journal of Food and Agro-Industry* 36: 229–233.
- Sivachandra Kumar N.T. & Banniza S.** (2017). Assessment of the Effect of Seed Infection with *Ascochyta pisi* on Pea in Western Canada. *Front. Plant Sci.* 8 (933): 1-7.
- Sivachandra Kumar N.T.** (2016). Evaluation of the relative importance of *Ascochyta pisi* in the *Ascochyta* blight complex of pea in Saskatchewan. *Thesis. University of Saskatchewan. Canada*.
- Skoglund L.G., Harveson R.M., Chen W., Dugan F., Schwartz H.F., Markell S.G., Porter L., Burrows M.L. & Goswami R.** (2011). *Ascochyta* Blight of Peas. *Plant Health Progress*. 12 (1): 1-9.

- Smarrt J.** (1996). Food and Feed from Legumes and Oilseeds. *Chapman & Hall, London, UK.* 428p.
- Smith J.L., De Moraes C.M. & Mescher M.C.** (2009). Jasmonate and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens, and parasitic plants. *Pest Management Science* 65: 497–503.
- Snowdon A.L.** (2010). A Colour Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. VoL. 2: Vegetables. *Manson Publishing Ltd.* pp 106-110.
- Solh M.B., Halila H.M., Hernandez-Bravo G., Malik B.A., Mihov M.I. & Sadri B.** (1994). Biotic and abiotic stresses constraining the productivity of cool season food legumes in different farming systems: specific examples. pp 219-230 in: Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes. Muehlbauer F. J. and W. J. Kaiser, (eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Spegazzini, C.** (1899). Fungi Argentini novi vel critici. *Anales del Museo Nacional de Historia Natural Buenos Aires.* 6: 81-365.
- Springob K. & Kutchan T.M.** (2009). Introduction to the Different Classes of Natural Products. pp 3-50. *in: Plant-derived Natural Products, Synthesis, Function, and Application.* Osbourn A.E. & Lanzotti V. (eds). *Springer Science+Business Media, LLC.*
- Stalikas C.D.** (2007) Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* 30: 3268-3295.
- Stalikas C.D.** (2010). Phenolic Acids and Flavonoids: Occurrence and Analytical Methods. pp 65-90. *in: Free Radicals and Antioxidant Protocols, Methods in Molecular Biology.* Uppu R.M., Murthy S.N., Pryor W.A. & Parinandi, N.L. (eds). *Humana Press, Springer Science+Business Media, LLC.*
- Stangarlin J.R., Schwan-Estrada K.R.F., MES C., Nozaki M.H.** (1999). Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 2 (11): 16–21.
- Stergiopoulos I., Collemare J., Mehrabi R. & De Wit P.J.G.M.** (2012). Phytotoxic secondary metabolites and peptides produced by plant pathogenic Dothideomycete fungi. *FEMS Microbiology Reviews* &&: 1–27.
- Stoddard F.L., Nicholas A.H., Rubiales D., Thomas J. & Villegas-Fernandez A.M.** (2010). Integrated pest management in faba bean. *Field Crops Research* 115: 308–318.
- Strange R.N. & Scott P.R.** (2005). Plant Disease: A Threat to Global Food Security. *Annual Review of Phytopathology* 43: 83–116.

- Strange R.N.** (2003). Introduction to Plant Pathology. *John Wiley & Sons Ltd.* 497p.
- Strange R.N.** (2006). Counteracting virulence mechanisms of grain legume pathogens. *Euphytica* 147: 49–65.
- Sudheesh S., Rodda M.S., Davidson J.A., Javid M., Stephens A., Slater A.T., Cogan N.O.I., Forster J.W & Kaur S.** (2016). SNP-Based Linkage Mapping for Validation of QTLs for Resistance to Ascochyta Blight in Lentil. *Front. Plant Sci.* 7(1604): 1-12.
- Suffert F. & Thompson R.N.** (2018). Some reasons why the latent period should not always be considered constant over the course of a plant disease epidemic. *Plant Pathology* 67 (9): 1831-1840.
- Suffert F.** (2017). Death of the assumption that ‘latent period’ is fixed over the course of a plant disease epidemic. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/148619>
- Suzuki T., Maeda A., Hirose M., Ichinose Y., Shiraishi T. & Toyoda K.** (2017). Ultrastructural and Cytological Studies on Mycosphaerella pinodes Infection of the Model Legume Medicago truncatula. *Front. Plant Sci.* 8 (1132): 1-12.
- Svetaz L., Tapia A., López S.N., Furlàn R.L.E., Petenatti E., Pioli R., Schmeda-Hirschmann G. & Zacchino S.A.** (2004). Antifungal Chalcones and New Caffeic Acid Esters from Zuccagnia punctata Acting against Soybean Infecting Fungi. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3297-3300.
- Tadja A., Benkada Y.M., Rickauer M., Bendahmane B.S. & Benkhelifa M.** (2009). Characterization of Ascochyta as Pathological Species of Pea (Pisum sativum L.) at the North-West of Algeria. *Journal of Agronomy* 8(3): 100-106.
- Talapatra S.K. & Talapatra B.** (2015). Chemistry of Plant Natural Products. Stereochemistry, Conformation, Synthesis, Biology, and Medicine. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg Germany.* 1196p.
- Talbot N.J.** (2004). Emerging themes in plant–pathogen interactions. pp 16-41. *in: Plant–Pathogen Interactions*, Talbot N.J. (ed). *Blackwell Publishing Ltd & CRC Press.*
- Tar’an B., Warkentin T., Somers D.J., Miranda D., Vandenburg A., Blade S., Woods S., Bing D., Xue A., DeKoeper D. & Penner G.** (2003). Quantitative trait loci for lodging resistance, plant height and partial resistance to Mycosphaerella blight in field pea (Pisum sativum L.). *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1482–1491.
- Tar’an B., Warkentin T., Tullu A. & Vandenberg A.** (2007). Genetic relationships among Chickpea (Cicer arietinum L.) genotypes based on the SSRs at the quantitative trait Loci for resistance to Ascochyta Blight. *Eur J Plant Pathol* 119: 39–51.

- Taylor P.W.J. & Ford R.** (2007). Diagnostics, genetic diversity and pathogenic variation of ascochyta blight of cool season food and feed legumes. *European Journal of Plant Pathology* 119: 127–133.
- Tegegne G., Pretorius J.C. & Swart W.J.** (2008). Antifungal properties of *Agapanthus africanus* L. extracts against plant pathogens. *Crop Protection* 27: 1052–1060.
- Tenhaken R. & Barz W.** (1991). Characterization of pectic enzymes from the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei*. *Zeitschrift für Naturforschung, Biochem. Biophys. Biol. Virol.* 46c: 51–57.
- Tenhaken R., Arnemann M., Köehler G. & Barz W.** (1997). Characterization and cloning of cutinase from *Ascochyta rabiei*. *Zeitschrift für Naturforschung, Biochem. Biophys. Biol. Virol.* 52: 197–208.
- Thakur M. & Sohal B.S.** (2013). Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection. *ISRN Biochemistry* Volume 2013, Article ID 762412, 10 pages.
- Tivoli B. & Banniza S.** (2007). Comparison of the epidemiology of ascochyta blight on grain legumes. *European Journal of Plant Pathology* 119:59-76.
- Tivoli B., Baranger A., Avila C. M., Banniza S., Barbetti M., Chen W., Davidson J.A., Lindeck K., Kharrat M., Rubiales D., Sadiki M., Sillero J. C., Sweetingham M. & Muehlbauer F. J.** (2006). Screening techniques and sources of resistance to foliar diseases caused by major necrotrophic fungi in grain legumes. *Euphytica* 147: 223-253.
- Tivoli B., Roger C., Onfroy C. & Lemarchand E.** (1996). Epidémiologie de l'antracnose et perspectives de lutte. *Forum pois, Paris 28 mars 1996, Editions ENIP* : 18-20.
- Torres A.M., Román B., Avila C.M., Satovic Z., Rubiales D., Sillero J.C., Cubero J.I. & Moreno M.T.** (2006). Faba bean breeding for resistance against biotic stresses: Towards application of marker technology. *Euphytica* 147: 67–80.
- Tran H.S.** (2017). Black spot disease complex in field pea – pathogens involved and interactions with host resistance. *PhD thesis. University of Western Australia. Australia.*
- Tran H.S., You M.P., Khan T. N., Pritchard I. & Barbetti M.J.** (2014a). Resistance in field pea (*Pisum sativum*) to the black spot disease complex in Western Australia. *European Journal of Plant Pathology* 140: 597–605.

- Tran H.S., You M.P., Khan T.N. & Barbetti M.J.** (2016). Pea black spot disease complex on field pea: dissecting the roles of the different pathogens in causing epicotyls and root disease. *European Journal of Plant Pathology* 144: 595–605.
- Tran H.S., You M.P., Lanoiselet V., Khan T. N & Barbetti M.J.** (2014b). First Report of *Phoma glomerata* Associated with the *Ascochyta* Blight Complex on Field Pea (*Pisum sativum*) in Australia. *Plant disease* 98 (3): 427-427.
- Tran H.S., You M.P., Khan T.N. & Barbetti M.J.** (2017). Infection process of *Phoma koolunga* on stem and leaf tissue of resistant and susceptible field pea (*Pisum sativum*). *Plant Pathology* 66 (2): 212-222.
- Trapero-Casas A. & Kaiser W.A.** (1992b). Influence of temperature, wetness period, plant age, and inoculum concentration on infection and development of *ascochyta* blight of chickpea. *Phytopathology* 82: 589–596.
- Trapero-Casas A. & Kaiser W.J.** (2007). Differences between ascospores and conidia of *Didymella rabiei* in spore germination and infection of chickpea. *Phytopathology* 97:1600-1607.
- Trapero-Casas A., Luque-Márquez F. & Kaiser W.J.** (2012). Development of the teleomorph of *Ascochyta rabiei* on culture media. *European Journal of Plant Pathology* 134: 773–782.
- Truong D-H., Nguyen D.H., Ta N.T.A., Bui A.V., Do T.H. & Nguyen H.C.** (2019). Evaluation of the Use of Different Solvents for Phytochemical Constituents, Antioxidants, and In Vitro Anti-Inflammatory Activities of *Severinia buxifolia*. *Journal of Food Quality*. Article ID 8178294. 9 pages.
- Uldahl S.A. & Knutsen G.** (2009). Spore swelling and germination as a bioassay for the rapid screening of crude biological extracts for antifungal activity. *Journal of Microbiological Methods* 79: 82–88.
- Vad K., Mikkelsen J.D., & Collinge D.B.** (1991). Induction, purification and characterization of chitinase isolated from pea leaves inoculated with *Ascochyta pisi*. *Planta* 184: 24-29.
- Vail S.L.** (2005). Population studies of *Ascochyta rabiei* on chickpea in Saskatchewan. *Thesis. University of Saskatchewan Saskatoon. Canada.*
- Van Etten H.D., Mansfield J.W., Bailey J.A., & Farmer E.** (1994). Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus phytoanticipins. *Plant Cell* 6: 1191-1192.

- Van Loon L.C.** (1999). Occurrence and Properties of Plant Pathogenesis-Related Proteins. pp 12-31. *in*: Pathogenesis-Related Proteins in Plants. Datta S.K. & Muthukrishnan S. (eds). *CRC Press LLC*.
- Varejão E.V.V., Demuner A.J., Barbosa L.C.A. & Barreto R.W.** (2013). The search for new natural herbicides - Strategic approaches for discovering fungal phytotoxins. *Crop Protection* 48 : 41-50.
- Venora G. & Porta-Puglia A.** (1993). Observations on outer cell layers of stem in chickpea cultivars susceptible and resistant to *Ascochyta* blight. *Petria* 3: 177–182.
- Verma S., Kumar R. Gazara, Nizam S., Parween S.** (2016). Chattopadhyay D. & Verma P.K. Draft genome sequencing and secretome analysis of fungal phytopathogen *Ascochyta rabiei* provides insight into the necrotrophic effector repertoire. *Scientific Reports* 6 (24638): 1-14.
- Vermerris W. & Nicholson R.** (2006). Phenolic Compound Biochemistry. *Springer Publisher. Dordrecht, the Netherlands*. 285p.
- Vessereau A.**, 1992. Méthodes statistiques en biologie et en agronomie. 2<sup>ème</sup> édition. *Techniques et Documentation. Lavoisier. France*. 540p.
- Vidhyasekaran P.** (2008). Fungal Pathogenesis in Plants and Crops. Molecular Biology and Host Defense Mechanisms. Second Edition. *Taylor & Francis Group, LLC*.
- Vogelsang R. & Barz W.** (1990). Elicitation of  $\beta$ -1,3-Glucanase and Chitinase Activities in Cell Suspension Cultures of *Ascochyta rabiei* Resistant and Susceptible Cultivars of Chickpea (*Cicer avietinum*). *Zeitschrift für Naturforschung* 45c: 233-239.
- Walsh G.** (2003). Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology. 2nd edition. *John Wiley & Sons Chichester, West Sussex, England*. 551 p.
- Wang H., Hwang S.F., Chang K.F., Turnbullg.D. & Howard R.J.,** (2003). Suppression of important pea diseases by bacterial antagonists. *Biological Control* 48: 447–460.
- Warkentin T.D., Rashid K.Y. & Xue A.G.** (1996) Fungicidal control of *Ascochyta* blight of field pea. *Canadian Journal of Plant Science* 76: 67–71.
- Warkentin T.D., Xue A.G. & McAndrew D.W.** (2000). Effect of mancozeb on the control of *Mycosphaerella* blight of field pea. *Canadian Journal of Plant Science* 80: 403–406.
- Wedge D.E. & Smith B.J.** (2006). Discovery and Evaluation of Natural Product-Based Fungicides for Disease Control of Small Fruits. pp 1-14. *in*: Allelochemicals: Biological

- Control of Plant Pathogens and Diseases. Inderjit & Mukerji K.G. (eds). *Springer, Netherlands*.
- White D. & Chen W.** (2007). Towards identifying pathogenic determinants of the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei*. *European Journal of Plant Pathology* 119: 3–12.
- Widholm J.M.** (2003). Foreword. pp ix-xi. *in: Applied Genetics of Leguminosae Biotechnology*. Jaiwal P.K. & Singh R.P. (eds). *Springer Science+Business Media Dordrecht*.
- Wise K.A., Bradley C.A., Markell S., Pasche J., Delgado J.A., Goswami R.S. & Gudmestad N.C.** (2011). Sensitivity of *Ascochyta rabiei* populations to prothioconazole and thiabendazole. *Crop Protection* 30: 1000-1005.
- Wroth J.M.** (1998). Possible role for wild genotypes of *Pisum* spp. to enhance ascochyta blight resistance in pea. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 38: 469–479.
- Xue A.G.** (2000). Effect of seed-born *Mycosphaerella pinodes* and seed treatments on emergence, foot rot severity and yield of field pea. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22 (3): 248-253.
- Ye G., McNeil D.L. & Hill G.D.** (2002). Breeding for resistance to lentil *Ascochyta* blight. *Plant Breeding* 121: 185–191.
- Zaghouane O.** (1997). La situation actuelle et les perspectives de développement des légumineuses en Algérie. *Revue céréaliculture*.
- Zerroug M.M., Bouznad Z., Larous L. & Strange R.N.** (2007). Production of solanapyrone a by algerian isolates of *ascochyta rabiei* as the cause of the toxicity of culture filtrates to chickpea (*cicer arietinum*) seeds and seedlings. *Journal of Plant Pathology* 89 (2): 227-232.
- Zhang J.X., Fernando W.G.D. & Xue A.G.** (2005). Effect of residue type and burial depth on survival of *Mycosphaerella pinodes* in Manitoba. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27: 132-136.
- Zhang L., Peek A.S., Dunams D. & Gaut B.S.** (2002). Population genetics of duplicated disease-defense genes, hm1 and hm2, in maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.) and its wild ancestor (*Zea mays* ssp. *parviglumis*). *Genetics*, 162, 851- 860.

# **Annexes**

**Annexe 1 : ANOVA des résultats de l'effet des extraits bruts sur la croissance.**• *Ascochyta rabiei*

| Source de Variation              | S.C.E    | DDL | C.M.     | TEST F   | P       | E.T.  | C.V.   |
|----------------------------------|----------|-----|----------|----------|---------|-------|--------|
| Variation Totale                 | 47581,04 | 149 | 319,336  |          |         |       |        |
| Variation Facteur 1 : Traitement | 37273,05 | 9   | 4141,451 | 1297,106 | 0,000** |       |        |
| Variation Facteur 2 : Dose       | 3540,469 | 2   | 1770,234 | 554,439  | 0,000** |       |        |
| Variation Interaction F1*F2      | 6384,371 | 18  | 354,687  | 111,088  | 0,000** |       |        |
| Variation Résiduelle             | 383,141  | 120 | 3,193    |          |         | 1,787 | 14,80% |

• *Ascochyta pinodes*

| Source de Variation              | S.C.E    | DDL | C.M.     | TEST F  | P       | E.T.  | C.V.   |
|----------------------------------|----------|-----|----------|---------|---------|-------|--------|
| Variation Totale                 | 58334,43 | 149 | 391,506  |         |         |       |        |
| Variation Facteur 1 : Traitement | 44003,55 | 9   | 4889,283 | 168,352 | 0,000** |       |        |
| Variation Facteur 2 : Dose       | 4184,414 | 2   | 2092,207 | 72,041  | 0,000** |       |        |
| Variation Interaction F1*F2      | 6661,418 | 18  | 370,079  | 12,743  | 0,000** |       |        |
| Variation Résiduelle             | 3485,047 | 120 | 29,042   |         |         | 5,389 | 39,43% |

• *Phoma medicaginis* Variation *pinodella*

| Source de Variation              | S.C.E    | DDL | C.M.     | TEST F  | P       | E.T.  | C.V.   |
|----------------------------------|----------|-----|----------|---------|---------|-------|--------|
| Variation Totale                 | 60431,86 | 149 | 405,583  |         |         |       |        |
| Variation Facteur 1 : Traitement | 49712,86 | 9   | 5523,65  | 1917,99 | 0,000** |       |        |
| Variation Facteur 2 : Dose       | 3615,035 | 2   | 1807,518 | 627,629 | 0,000** |       |        |
| Variation Interaction F1*F2      | 6758,379 | 18  | 375,466  | 130,374 | 0,000** |       |        |
| Variation Résiduelle             | 345,59   | 120 | 2,88     |         |         | 1,697 | 11,24% |

• *Ascochyta pisi*

| Source de Variation              | S.C.E    | DDL | C.M.     | TEST F   | P       | E.T.  | C.V.  |
|----------------------------------|----------|-----|----------|----------|---------|-------|-------|
| Variation Totale                 | 183770,3 | 149 | 1233,357 |          |         |       |       |
| Variation Facteur 1 : Traitement | 153819,2 | 9   | 17091,02 | 1774,85  | 0,000** |       |       |
| Variation Facteur 2 : Dose       | 20570,55 | 2   | 10285,27 | 1068,094 | 0,000** |       |       |
| Variation Interaction F1*F2      | 8224,938 | 18  | 456,941  | 47,452   | 0,000** |       |       |
| Variation Résiduelle             | 1155,547 | 120 | 9,63     |          |         | 3,103 | 4,58% |

**Annexe 2 : ANOVA des résultats de l'effet des extraits bruts sur la sporulation.**• *A. rabiei*

| Source de Variation              | S.C.E    | DDL | C.M.     | TEST F   | P       | E.T.  | C.V.  |
|----------------------------------|----------|-----|----------|----------|---------|-------|-------|
| Variation Totale                 | 47488,39 | 149 | 318,714  |          |         |       |       |
| Variation Facteur 1 : Traitement | 42401,5  | 9   | 4711,277 | 1578,011 | 0,000** |       |       |
| Variation Facteur 2 : Dose       | 3028,715 | 2   | 1514,357 | 507,224  | 0,000** |       |       |
| Variation Interaction F1*F2      | 1699,91  | 18  | 94,439   | 31,632   | 0,000** |       |       |
| Variation Résiduelle             | 358,27   | 120 | 2,986    |          |         | 1,728 | 4,18% |

ANOVA : Analyse de variance ; F : Facteur ; SCE : Somme des carrés des écarts ; DDL : Degré de liberté ; Test F : Test Fischer ; P : Probabilité ; ET : Ecart-type ; CV : Coefficient de variation ; \*\* : Hautement significatif ; \* : Significatif ; NS : Non significatif.

- *A. pinodes*

| Source de Variation              | S.C.E    | DDL | C.M.     | TEST F  | P       | E.T. | C.V.  |
|----------------------------------|----------|-----|----------|---------|---------|------|-------|
| Variation Totale                 | 30613,7  | 149 | 205,461  |         |         |      |       |
| Variation Facteur 1 : Traitement | 27023,67 | 9   | 3002,63  | 728,937 | 0,000** |      |       |
| Variation Facteur 2 : Dose       | 2097,451 | 2   | 1048,726 | 254,595 | 0,000** |      |       |
| Variation Interaction F1*F2      | 998,273  | 18  | 55,46    | 13,464  | 0,000** |      |       |
| Variation Résiduelle             | 494,303  | 120 | 4,119    |         |         | 2,03 | 5,86% |

- *P. medicaginis Variation pinodella*

| Source de Variation              | S.C.E    | DDL | C.M.    | TEST F   | P       | E.T.  | C.V.  |
|----------------------------------|----------|-----|---------|----------|---------|-------|-------|
| Variation Totale                 | 25113,13 | 149 | 168,545 |          |         |       |       |
| Variation Facteur 1 : Traitement | 23434,29 | 9   | 2603,81 | 1688,263 | 0,000** |       |       |
| Variation Facteur 2 : Dose       | 844,877  | 2   | 422,439 | 273,901  | 0,000** |       |       |
| Variation Interaction F1*F2      | 648,891  | 18  | 36,049  | 23,374   | 0,000** |       |       |
| Variation Résiduelle             | 185,076  | 120 | 1,542   |          |         | 1,242 | 3,56% |

- *A. pisi*

| Source de Variation              | S.C.E    | DDL | C.M.     | TEST F   | P       | E.T.  | C.V.  |
|----------------------------------|----------|-----|----------|----------|---------|-------|-------|
| Variation Totale                 | 111622,9 | 149 | 749,147  |          |         |       |       |
| Variation Facteur 1 : Traitement | 30225,43 | 9   | 3358,381 | 1449,946 | 0,000** |       |       |
| Variation Facteur 2 : Dose       | 54368,18 | 2   | 27184,09 | 11736,45 | 0,000** |       |       |
| Variation Interaction F1*F2      | 26751,34 | 18  | 1486,186 | 641,645  | 0,000** |       |       |
| Variation Résiduelle             | 277,945  | 120 | 2,316    |          |         | 1,522 | 4,81% |

### Annexe 3 : ANOVA des résultats de l'effet des extraits bruts sur la germination.

- *A. rabiei*

| Source de Variation              | S.C.E    | DDL | C.M.     | TEST F   | P       | E.T.  | C.V.  |
|----------------------------------|----------|-----|----------|----------|---------|-------|-------|
| Variation Totale                 | 108556,5 | 149 | 728,567  |          |         |       |       |
| Variation Facteur 1 : Traitement | 71716    | 9   | 7968,444 | 2045,308 | 0,000** |       |       |
| Variation Facteur 2 : Dose       | 18861,83 | 2   | 9430,914 | 2420,688 | 0,000** |       |       |
| Variation Interaction F1*F2      | 17511,12 | 18  | 972,84   | 249,705  | 0,000** |       |       |
| Variation Résiduelle             | 467,516  | 120 | 3,896    |          |         | 1,974 | 9,87% |

- *A. pinodes*

| Source de Variation              | S.C.E    | DDL | C.M.     | TEST F   | P       | E.T.  | C.V.  |
|----------------------------------|----------|-----|----------|----------|---------|-------|-------|
| Variation Totale                 | 103487,6 | 149 | 694,547  |          |         |       |       |
| Variation Facteur 1 : Traitement | 76604,21 | 9   | 8511,579 | 2805,774 | 0,000** |       |       |
| Variation Facteur 2 : Dose       | 13363,16 | 2   | 6681,578 | 2202,529 | 0,000** |       |       |
| Variation Interaction F1*F2      | 13156,16 | 18  | 730,898  | 240,935  | 0,000** |       |       |
| Variation Résiduelle             | 364,031  | 120 | 3,034    |          |         | 1,742 | 7,78% |

- *P. medicaginis Variation pinodella*

ANOVA: Analyse de variance ; F: Facteur ; SCE : Somme des carrés des écarts ; DDL : Degré de liberté ; Test F : Test Fischer ; P : Probabilité ; ET : Ecart-type ; CV : Coefficient de variation ; \*\* : Hautement significatif ; \* : Significatif ; NS : Non significatif.

| Source de Variation              | S.C.E    | DDL | C.M.     | TEST F   | P       | E.T.  | C.V.   |
|----------------------------------|----------|-----|----------|----------|---------|-------|--------|
| Variation Totale                 | 64094,09 | 149 | 430,162  |          |         |       |        |
| Variation Facteur 1 : Traitement | 32370,68 | 9   | 3596,743 | 1034,143 | 0,000** |       |        |
| Variation Facteur 2 : Dose       | 16176,6  | 2   | 8088,301 | 2325,564 | 0,000** |       |        |
| Variation Interaction F1*F2      | 15129,45 | 18  | 840,525  | 241,669  | 0,000** |       |        |
| Variation Résiduelle             | 417,359  | 120 | 3,478    |          |         | 1,865 | 11,52% |

- *A. pisi*

| Source de Variation              | S.C.E    | DDL | C.M.     | TEST F   | P       | E.T.  | C.V.   |
|----------------------------------|----------|-----|----------|----------|---------|-------|--------|
| Variation Totale                 | 100697,8 | 149 | 675,824  |          |         |       |        |
| Variation Facteur 1 : Traitement | 68739,09 | 9   | 7637,677 | 1301,891 | 0,000** |       |        |
| Variation Facteur 2 : Dose       | 16390,2  | 2   | 8195,098 | 1396,907 | 0,000** |       |        |
| Variation Interaction F1*F2      | 14864,55 | 18  | 825,809  | 140,764  | 0,000** |       |        |
| Variation Résiduelle             | 703,992  | 120 | 5,867    |          |         | 2,422 | 10,46% |

#### Annexe 4 : ANOVA des résultats de l'effet des sous-fractions sur la croissance.

- *A. rabiei*

| Source de Variation            | S.C.E    | DDL | C.M.     | TEST F   | P       | E.T.  | C.V.  |
|--------------------------------|----------|-----|----------|----------|---------|-------|-------|
| Variation Totale               | 57527,33 | 69  | 833,729  |          |         |       |       |
| Variation Facteur : Traitement | 57318,54 | 13  | 4409,119 | 1182,584 | 0,000** |       |       |
| Variation Résiduelle           | 208,789  | 56  | 3,728    |          |         | 1,931 | 3,56% |

- *A. pinodes*

| Source de Variation            | S.C.E    | DDL | C.M.     | TEST F  | P       | E.T.  | C.V.  |
|--------------------------------|----------|-----|----------|---------|---------|-------|-------|
| Variation Totale               | 53945,42 | 69  | 781,818  |         |         |       |       |
| Variation Facteur : Traitement | 53709,52 | 13  | 4131,501 | 980,762 | 0,000** |       |       |
| Variation Résiduelle           | 235,902  | 56  | 4,213    |         |         | 2,052 | 3,72% |

#### Annexe 5 : ANOVA des résultats de l'effet des sous-fractions sur la sporulation.

- *A. rabiei*

| Source de Variation            | S.C.E    | DDL | C.M.     | TEST F  | P       | E.T.  | C.V.  |
|--------------------------------|----------|-----|----------|---------|---------|-------|-------|
| Variation Totale               | 22000,41 | 69  | 318,847  |         |         |       |       |
| Variation Facteur : Traitement | 21872,35 | 13  | 1682,488 | 735,707 | 0,000** |       |       |
| Variation Résiduelle           | 128,066  | 56  | 2,287    |         |         | 1,512 | 7,25% |

- *A. pinodes*

| Source de Variation            | S.C.E    | DDL | C.M.    | TEST F  | P       | E.T.  | C.V.  |
|--------------------------------|----------|-----|---------|---------|---------|-------|-------|
| Variation Totale               | 9779,855 | 69  | 141,737 |         |         |       |       |
| Variation Facteur : Traitement | 9684,204 | 13  | 744,939 | 436,132 | 0,000** |       |       |
| Variation Résiduelle           | 95,651   | 56  | 1,708   |         |         | 1,307 | 8,58% |

#### Annexe 6 : ANOVA des résultats de l'effet des sous-fractions sur la germination.

- *A. rabiei*

ANOVA : Analyse de variance ; F : Facteur ; SCE : Somme des carrés des écarts ; DDL : Degré de liberté ; Test F : Test Fischer ; P : Probabilité ; ET : Ecart-type ; CV : Coefficient de variation ; \*\* : Hautement significatif ; \* : Significatif ; NS : Non significatif.

| Source de Variation            | S.C.E    | DDL | C.M.     | TEST F  | P       | E.T.  | C.V.  |
|--------------------------------|----------|-----|----------|---------|---------|-------|-------|
| Variation Totale               | 65214,76 | 69  | 945,142  |         |         |       |       |
| Variation Facteur : Traitement | 64916,82 | 13  | 4993,602 | 938,592 | 0,000** |       |       |
| Variation Résiduelle           | 297,938  | 56  | 5,32     |         |         | 2,307 | 4,43% |

- *A. pinodes*

| Source de Variation            | S.C.E    | DDL | C.M.     | TEST F   | P       | E.T.  | C.V.  |
|--------------------------------|----------|-----|----------|----------|---------|-------|-------|
| Variation Totale               | 57907,39 | 69  | 839,238  |          |         |       |       |
| Variation Facteur : Traitement | 57756,43 | 13  | 4442,803 | 1648,174 | 0,000** |       |       |
| Variation Résiduelle           | 150,953  | 56  | 2,696    |          |         | 1,642 | 3,16% |

## Annexe 7 : ANOVA des résultats de l'effet des extraits sur la durée d'incubation.

- *A. rabiei/pois chiche*

| Source de Variation              | S.C.E    | DDL | C.M.   | TEST F  | P                    | E.T.  | C.V.  |
|----------------------------------|----------|-----|--------|---------|----------------------|-------|-------|
| Variation Totale                 | 2490,979 | 47  | 53     |         |                      |       |       |
| Variation Facteur 1 : Traitement | 2428,646 | 7   | 346,95 | 260,212 | 0,000**              |       |       |
| Variation Facteur 2 : Temps      | 6,75     | 1   | 6,75   | 5,063   | 0,02988*             |       |       |
| Variation Interaction F1*F2      | 12,916   | 7   | 1,845  | 1,384   | 0,2455 <sup>NS</sup> |       |       |
| Variation Résiduelle             | 42,667   | 32  | 1,333  |         |                      | 1,155 | 0,88% |

- *Le complexe ascochyta/pois*

| Source de Variation              | S.C.E    | DDL | C.M.    | TEST F  | P                     | E.T.  | C.V.  |
|----------------------------------|----------|-----|---------|---------|-----------------------|-------|-------|
| Variation Totale                 | 2695,479 | 47  | 57,351  |         |                       |       |       |
| Variation Facteur 1 : Traitement | 2615,729 | 7   | 373,676 | 191,834 | 0,000**               |       |       |
| Variation Facteur 2 : Temps      | 4,688    | 1   | 4,688   | 2,406   | 0,12684 <sup>NS</sup> |       |       |
| Variation Interaction F1*F2      | 12,729   | 7   | 1,818   | 0,934   | 0,49532 <sup>NS</sup> |       |       |
| Variation Résiduelle             | 62,333   | 32  | 1,948   |         |                       | 1,396 | 2,34% |

## Annexe 8 : ANOVA des résultats de l'effet des extraits sur la durée de latence.

- *A. rabiei/pois chiche*

| Source de Variation              | S.C.E   | DDL | C.M.   | TEST F | P                     | E.T.  | C.V.  |
|----------------------------------|---------|-----|--------|--------|-----------------------|-------|-------|
| Variation Totale                 | 694,745 | 47  | 14,782 |        |                       |       |       |
| Variation Facteur 1 : Traitement | 651,703 | 7   | 93,1   | 88,491 | 0,000**               |       |       |
| Variation Facteur 2 : Temps      | 5,005   | 1   | 5,005  | 4,758  | 0,06079 <sup>NS</sup> |       |       |
| Variation Interaction F1*F2      | 4,37    | 7   | 0,624  | 0,593  | 0,75769 <sup>NS</sup> |       |       |
| Variation Résiduelle             | 33,667  | 32  | 1,052  |        |                       | 1,026 | 0,68% |

- *Le complexe ascochyta/pois*

| Source de Variation | S.C.E   | DDL | C.M.   | TEST F | P | E.T. | C.V. |
|---------------------|---------|-----|--------|--------|---|------|------|
| Variation Totale    | 1131,87 | 47  | 24,082 |        |   |      |      |

ANOVA : Analyse de variance ; F : Facteur ; SCE : Somme des carrés des écarts ; DDL : Degré de liberté ; Test F : Test Fischer ; P : Probabilité ; ET : Ecart-type ; CV : Coefficient de variation ; \*\* : Hautement significatif ; \* : Significatif ; NS : Non significatif.

|                                  |          |    |         |         |                    |       |       |
|----------------------------------|----------|----|---------|---------|--------------------|-------|-------|
| Variation Facteur 1 : Traitement | 1078,245 | 7  | 154,035 | 111,603 | 0,000**            |       |       |
| Variation Facteur 2 : Temps      | 7,922    | 1  | 7,922   | 5,74    | 0,02154*           |       |       |
| Variation Interaction F1*F2      | 1,536    | 7  | 0,219   | 0,159   | 0,99 <sup>NS</sup> |       |       |
| Variation Résiduelle             | 44,167   | 32 | 1,38    |         |                    | 1,175 | 1,10% |

**Annexe 9 :** ANOVA des résultats de l'effet des extraits sur la sévérité (DI) de l'ascochytose.

- *Sur pois chiche*

| Source de Variation              | S.C.E | DDL | C.M.  | TEST F  | P                     | E.T.  | C.V.  |
|----------------------------------|-------|-----|-------|---------|-----------------------|-------|-------|
| Variation Totale                 | 5,468 | 59  | 0,093 |         |                       |       |       |
| Variation Facteur 1 : Traitement | 5,408 | 9   | 0,601 | 498,617 | 0,000**               |       |       |
| Variation Facteur 2 : Temps      | 0     | 1   | 0     | 0,232   | 0,63756 <sup>NS</sup> |       |       |
| Variation Interaction F1*F2      | 0,012 | 9   | 0,001 | 1,104   | 0,38231 <sup>NS</sup> |       |       |
| Variation Résiduelle             | 0,048 | 40  | 0,001 |         |                       | 0,035 | 6,07% |

- *Sur pois*

| Source de Variation              | S.C.E | DDL | C.M.  | TEST F  | P                     | E.T.  | C.V.  |
|----------------------------------|-------|-----|-------|---------|-----------------------|-------|-------|
| Variation Totale                 | 6,467 | 59  | 0,11  |         |                       |       |       |
| Variation Facteur 1 : Traitement | 6,397 | 9   | 0,711 | 636,439 | 0,000**               |       |       |
| Variation Facteur 2 : Temps      | 0,004 | 1   | 0,004 | 3,73    | 0,05762 <sup>NS</sup> |       |       |
| Variation Interaction F1*F2      | 0,022 | 9   | 0,002 | 2,172   | 0,04503*              |       |       |
| Variation Résiduelle             | 0,045 | 40  | 0,001 |         |                       | 0,033 | 6,18% |

**Annexe 10** : Comparaison des moyennes de la croissance mycélienne.• *A. rabiei*

| TRAITEMENTS       | GROUPES HOMOGENES |   |   |   |   |   |   |   | TRAITEMENTS         | GROUPES HOMOGENES |  |  |  |  |  |  |  |   |   |
|-------------------|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|---------------------|-------------------|--|--|--|--|--|--|--|---|---|
| P. harmala 6%     | A                 |   |   |   |   |   |   |   | T. hirsuta 6%       |                   |  |  |  |  |  |  |  | H | I |
| A. alba 6%        |                   | B |   |   |   |   |   |   | T. garganica 6%     |                   |  |  |  |  |  |  |  |   | I |
| P. harmala 3%     |                   | B |   |   |   |   |   |   | A. campestris 1,5%  |                   |  |  |  |  |  |  |  |   | I |
| A. alba 3%        |                   |   | C |   |   |   |   |   | T. microphylla 3%   |                   |  |  |  |  |  |  |  |   | I |
| P. harmala 1,5%   |                   |   |   | D |   |   |   |   | T. hirsuta 3%       |                   |  |  |  |  |  |  |  |   | I |
| A. campestris 6%  |                   |   |   |   | E |   |   |   | T. garganica 3%     |                   |  |  |  |  |  |  |  |   | I |
| L. arabicum 6%    |                   |   |   |   | E |   |   |   | T. garganica 1,5%   |                   |  |  |  |  |  |  |  |   | I |
| L. arabicum 3%    |                   |   |   |   |   | F |   |   | C. arabica 6%       |                   |  |  |  |  |  |  |  |   | I |
| A. alba 1,5%      |                   |   |   |   |   | F |   |   | T. hirsuta 1,5%     |                   |  |  |  |  |  |  |  |   | I |
| L. arabicum 1,5%  |                   |   |   |   |   | F |   |   | C. arabica 3%       |                   |  |  |  |  |  |  |  |   | I |
| A. campestris 3%  |                   |   |   |   |   | F | G |   | C. arabica 1,5%     |                   |  |  |  |  |  |  |  |   | I |
| Ethanol           |                   |   |   |   |   | F | G |   | T. microphylla 1,5% |                   |  |  |  |  |  |  |  |   | I |
| T. microphylla 6% |                   |   |   |   |   |   | G | H | Témoin              |                   |  |  |  |  |  |  |  |   | I |

• *A. pinodes*

| TRAITEMENTS       | GROUPES HOMOGENES |   |   |   |   |  |  |  | TRAITEMENTS         | GROUPES HOMOGENES |  |  |  |  |  |  |  |  |   |
|-------------------|-------------------|---|---|---|---|--|--|--|---------------------|-------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|---|
| A. alba 6%        | A                 |   |   |   |   |  |  |  | T. hirsuta 6%       |                   |  |  |  |  |  |  |  |  | E |
| P. harmala 6%     | A                 |   |   |   |   |  |  |  | L. arabicum 1,5%    |                   |  |  |  |  |  |  |  |  | E |
| A. alba 3%        |                   | B |   |   |   |  |  |  | A. campestris 1,5%  |                   |  |  |  |  |  |  |  |  | E |
| P. harmala 3%     |                   | B |   |   |   |  |  |  | T. microphylla 3%   |                   |  |  |  |  |  |  |  |  | E |
| P. harmala 1,5%   |                   |   | C |   |   |  |  |  | T. garganica 3%     |                   |  |  |  |  |  |  |  |  | E |
| A. campestris 6%  |                   |   |   | D |   |  |  |  | T. microphylla 1,5% |                   |  |  |  |  |  |  |  |  | E |
| A. alba 1,5%      |                   |   |   | D |   |  |  |  | C. arabica 6%       |                   |  |  |  |  |  |  |  |  | E |
| L. arabicum 6%    |                   |   |   | D |   |  |  |  | C. arabica 3%       |                   |  |  |  |  |  |  |  |  | E |
| A. campestris 3%  |                   |   |   |   | E |  |  |  | T. hirsuta 1,5%     |                   |  |  |  |  |  |  |  |  | E |
| L. arabicum 3%    |                   |   |   |   | E |  |  |  | T. hirsuta 3%       |                   |  |  |  |  |  |  |  |  | E |
| Ethanol           |                   |   |   |   | E |  |  |  | C. arabica 1,5%     |                   |  |  |  |  |  |  |  |  | E |
| T. garganica 6%   |                   |   |   |   | E |  |  |  | Témoin              |                   |  |  |  |  |  |  |  |  | E |
| T. microphylla 6% |                   |   |   |   | E |  |  |  | T. garganica 1,5%   |                   |  |  |  |  |  |  |  |  | E |

- *P. medicaginis var. pinodella*

| TRAITEMENTS       | GROUPES HOMOGENES |   |   |   |   |   | TRAITEMENTS         | GROUPES HOMOGENES |   |   |   |   |   |   |
|-------------------|-------------------|---|---|---|---|---|---------------------|-------------------|---|---|---|---|---|---|
| P. harmala 6%     | A                 |   |   |   |   |   | T. garganica 6%     | J                 | K |   |   |   |   |   |
| P. harmala 3%     |                   | B |   |   |   |   | T. garganica 3%     |                   | K | L |   |   |   |   |
| A. alba 6%        |                   |   | C |   |   |   | A. campestris 1,5%  |                   |   | L | M |   |   |   |
| A. alba 3%        |                   |   |   | D |   |   | T. microphylla 3%   |                   |   | L | M | N |   |   |
| P. harmala 1,5%   |                   |   |   |   | E |   | C. arabica 6%       |                   |   |   | M | N | O |   |
| A. alba 1,5%      |                   |   |   |   |   | F | T. hirsuta 1,5%     |                   |   |   | M | N | O |   |
| L. arabicum 6%    |                   |   |   |   |   |   | G                   | T. hirsuta 6%     |   |   |   | N | O | P |
| A. campestris 6%  | H                 |   |   |   |   |   | T. microphylla 1,5% |                   |   |   |   | N | O | P |
| A. campestris 3%  |                   | I |   |   |   |   | T. garganica 1,5%   |                   |   |   |   | N | O | P |
| L. arabicum 1,5%  |                   | I | J |   |   |   | T. hirsuta 3%       |                   |   |   |   | N | O | P |
| Ethanol           |                   | I | J |   |   |   | C. arabica 3%       |                   |   |   |   |   | O | P |
| T. microphylla 6% |                   | I | J |   |   |   | C. arabica 1,5%     |                   |   |   |   |   | O | P |
| L. arabicum 3%    |                   | I | J |   |   |   | Témoin              |                   |   |   |   |   |   | P |

- *A. pisi*

| TRAITEMENTS       | GROUPES HOMOGENES |   |   |   | TRAITEMENTS         | GROUPES HOMOGENES |   |   |   |   |   |
|-------------------|-------------------|---|---|---|---------------------|-------------------|---|---|---|---|---|
| P. harmala 6%     | A                 |   |   |   | T. hirsuta 3%       |                   |   | C | D |   |   |
| A. alba 6%        | A                 |   |   |   | A. campestris 3%    |                   |   |   | D | E |   |
| L. arabicum 6%    | A                 |   |   |   | T. microphylla 3%   |                   |   |   | D | E |   |
| T. garganica 6%   | A                 |   |   |   | T. garganica 1,5%   |                   |   |   |   | E |   |
| L. arabicum 3%    | A                 |   |   |   | L. arabicum 1,5%    |                   |   |   |   |   | F |
| A. campestris 6%  | A                 | B |   |   | A. alba 1,5%        |                   |   |   |   |   | F |
| T. hirsuta 6%     | A                 | B |   |   | T. microphylla 1,5% |                   |   |   |   |   | G |
| T. microphylla 6% | A                 | B |   |   | C. arabica 1,5%     |                   |   |   |   |   | G |
| C. arabica 6%     | A                 | B |   |   | A. campestris 1,5%  |                   |   |   |   |   | G |
| A. alba 3%        |                   | B | C |   | P. harmala 1,5%     | H                 |   |   |   |   |   |
| C. arabica 3%     |                   |   | C |   | T. hirsuta 1,5%     |                   | I |   |   |   |   |
| T. garganica 3%   |                   |   | C | D | Ethanol             |                   |   | J |   |   |   |
| P. harmala 3%     |                   |   | C | D | Témoin              |                   |   |   |   | K |   |

**Annexe 11** : Comparaison des moyennes de la sporulation.• *A. rabiei*

| TRAITEMENTS         | GROUPES HOMOGENES |   |   |   |   | TRAITEMENTS        | GROUPES HOMOGENES |   |   |   |   |   |   |
|---------------------|-------------------|---|---|---|---|--------------------|-------------------|---|---|---|---|---|---|
| C. arabica 1,5%     | O                 |   |   |   |   | T. microphylla 6%  |                   |   |   |   | J |   |   |
| Témoïn              | O                 |   |   |   |   | A. alba 1,5%       |                   |   |   |   |   | I |   |
| T. hirsuta 1,5%     | O                 |   |   |   |   | A. campestris 1,5% |                   |   |   |   |   | I |   |
| Ethanol             | O                 | N |   |   |   | P. harmala 6%      |                   |   |   |   |   |   | A |
| T. microphylla 1,5% | O                 | N |   |   |   | A. alba 6%         |                   |   |   |   |   | B |   |
| C. arabica 3%       |                   | N |   |   |   | P. harmala 3%      |                   |   |   |   |   | C |   |
| T. microphylla 3%   |                   | N |   |   |   | L. arabicum 6%     |                   |   |   |   |   | C |   |
| T. garganica 1,5%   |                   |   | M |   |   | A. alba 3%         |                   |   |   | D |   |   |   |
| T. hirsuta 3%       |                   |   |   | L |   | P. harmala 1,5%    |                   |   | E |   |   |   |   |
| T. hirsuta 6%       |                   |   |   |   | K | L. arabicum 3%     |                   | F |   |   |   |   |   |
| C. arabica 6%       |                   |   |   |   | K | L. arabicum 1,5%   |                   | F |   |   |   |   |   |
| T. garganica 3%     |                   |   |   |   | K | A. campestris 6%   |                   | G |   |   |   |   |   |
| T. garganica 6%     |                   |   |   |   | J | A. campestris 3%   | H                 |   |   |   |   |   |   |

• *A. pinodes*

| TRAITEMENTS         | GROUPES HOMOGENES |   |   | TRAITEMENTS       | GROUPES HOMOGENES |   |   |
|---------------------|-------------------|---|---|-------------------|-------------------|---|---|
| C. arabica 1,5%     | I                 |   |   | T. microphylla 6% |                   | G |   |
| Témoïn              | I                 | H |   | T. garganica 6%   |                   | G |   |
| T. hirsuta 1,5%     | I                 | H |   | A. alba 1,5%      |                   | F |   |
| T. garganica 1,5%   |                   | H |   | L. arabicum 1,5%  |                   | F |   |
| T. hirsuta 3%       |                   | H |   | A. campestris 3%  |                   | F | E |
| C. arabica 3%       |                   | H |   | A. campestris 6%  |                   |   | E |
| T. microphylla 1,5% |                   | H |   | L. arabicum 3%    |                   |   | D |
| Ethanol             |                   | H |   | P. harmala 1,5%   |                   |   | C |
| C. arabica 6%       |                   | H |   | A. alba 3%        |                   |   | C |
| T. hirsuta 6%       |                   | H |   | L. arabicum 6%    |                   |   | C |
| T. microphylla 3%   |                   |   | G | A. alba 6%        |                   |   | C |
| T. garganica 3%     |                   |   | G | P. harmala 3%     | B                 |   |   |
| A. campestris 1,5%  |                   |   | G | P. harmala 6%     |                   | A |   |

- *P. medicaginis var. pinodella*

| TRAITEMENTS         | GROUPES HOMOGENES |   |   |   | TRAITEMENTS      | GROUPES HOMOGENES |   |   |   |
|---------------------|-------------------|---|---|---|------------------|-------------------|---|---|---|
| Témoin              | K                 |   |   |   | T. hirsuta 6%    |                   |   | H |   |
| C. arabica 1,5%     |                   | J |   |   | T. garganica 6%  |                   |   | H |   |
| Ethanol             |                   | J |   |   | A. campestris 3% |                   |   | G |   |
| T. garganica 1,5%   |                   | J |   |   | A. alba 1,5%     |                   |   |   | F |
| C. arabica 6%       |                   | J |   |   | A. campestris 6% |                   |   |   | F |
| C. arabica 3%       |                   | J |   |   | L. arabicum 1,5% |                   |   |   | E |
| T. microphylla 1,5% |                   |   | I |   | A. alba 3%       | D                 |   |   |   |
| T. garganica 3%     |                   |   | I |   | L. arabicum 3%   |                   | C |   |   |
| A. campestris 1,5%  |                   |   | I |   | P. harmala 1,5%  |                   | C |   |   |
| T. hirsuta 1,5%     |                   |   | I |   | A. alba 6%       |                   | C |   |   |
| T. microphylla 3%   |                   |   | I |   | L. arabicum 6%   |                   | C |   |   |
| T. microphylla 6%   |                   |   | I | H | P. harmala 3%    |                   | B |   |   |
| T. hirsuta 3%       |                   |   | I | H | P. harmala 6%    |                   |   | A |   |

- *A. pisi*

| TRAITEMENTS         | GROUPES HOMOGENES |   |   |   | TRAITEMENTS       | GROUPES HOMOGENES |   |   |     |
|---------------------|-------------------|---|---|---|-------------------|-------------------|---|---|-----|
| A. campestris 1,5%  | M                 |   |   |   | A. alba 3%        | E                 |   |   |     |
| T. garganica 1,5%   |                   | L |   |   | T. microphylla 3% | E                 |   |   |     |
| L. arabicum 1,5%    |                   |   | K |   | L. arabicum 3%    |                   | D |   |     |
| T. hirsuta 1,5%     |                   |   |   | J | A. campestris 3%  |                   |   | C |     |
| Témoin              |                   |   |   | I | H                 | P. harmala 3%     |   |   | C   |
| Ethanol             |                   |   |   | I | H                 | A. alba 6%        |   |   | B   |
| C. arabica 1,5%     |                   |   |   | I | H                 | T. hirsuta 6%     |   |   | B A |
| T. microphylla 1,5% |                   |   |   |   | H                 | T. microphylla 6% |   |   | A   |
| A. alba 1,5%        |                   |   |   |   | G                 | T. garganica 6%   |   |   | A   |
| T. garganica 3%     |                   |   |   |   | G                 | C. arabica 6%     |   |   | A   |
| C. arabica 3%       | F                 |   |   |   |                   | P. harmala 6%     |   |   | A   |
| P. harmala 1,5%     |                   | E |   |   |                   | A. campestris 6%  |   |   | A   |
| T. hirsuta 3%       |                   | E |   |   |                   | L. arabicum 6%    |   |   | A   |

**Annexe 12** : Comparaison des moyennes de la germination des pycnidiospores.• *A. rabiei*

| TRAITEMENTS       | GROUPES HOMOGENES |   |   |   |   |   | TRAITEMENTS         | GROUPES HOMOGENES |   |   |   |
|-------------------|-------------------|---|---|---|---|---|---------------------|-------------------|---|---|---|
| P. harmala 6%     | A                 |   |   |   |   |   | T. microphylla 3%   | J                 |   |   |   |
| A. alba 6%        |                   | B |   |   |   |   | T. hirsuta 3%       | J                 | K |   |   |
| P. harmala 3%     |                   |   | C |   |   |   | L. arabicum 1,5%    |                   | K | L |   |
| A. alba 3%        |                   |   |   | D |   |   | A. campestris 1,5%  |                   | K | L |   |
| A. campestris 6%  |                   |   |   |   | E |   | T. garganica 3%     |                   | K | L |   |
| L. arabicum 6%    |                   |   |   |   | E |   | T. garganica 1,5%   |                   | K | L |   |
| A. campestris 3%  |                   |   |   |   | E |   | C. arabica 6%       |                   | K | L |   |
| T. garganica 6%   |                   |   |   |   |   | F | Ethanol             |                   | K | L |   |
| P. harmala 1,5%   |                   |   |   |   |   | G | T hirsuta 1,5%      |                   | K | L |   |
| L. arabicum 3%    | H                 |   |   |   |   |   | C. arabica 3%       |                   | K | L |   |
| T. microphylla 6% |                   | I |   |   |   |   | Témoïn              |                   |   |   | L |
| T. hirsuta 6%     |                   | I |   |   |   |   | C. arabica 1,5%     |                   |   |   | L |
| A. alba 1,5%      |                   | I |   |   |   |   | T. microphylla 1,5% |                   |   |   | L |

• *A. pinodes*

| TRAITEMENTS       | GROUPES HOMOGENES |   |   |   |   |   | TRAITEMENTS         | GROUPES HOMOGENES |   |   |   |   |
|-------------------|-------------------|---|---|---|---|---|---------------------|-------------------|---|---|---|---|
| P. harmala 6%     | A                 |   |   |   |   |   | L. arabicum 1,5%    | I                 | J |   |   |   |
| A. alba 6%        |                   | B |   |   |   |   | T. microphylla 3%   |                   | J |   |   |   |
| P. harmala 3%     |                   |   | C |   |   |   | A. campestris 3%    |                   |   | K |   |   |
| L. arabicum 6%    |                   |   |   | D |   |   | A. alba 1,5%        |                   |   | K |   |   |
| L. arabicum 3%    |                   |   |   |   | E |   | T. hirsuta 3%       |                   |   | K |   |   |
| A. alba 3%        |                   |   |   |   | E |   | A. campestris 1,5%  |                   |   |   | L |   |
| P. harmala 1,5%   |                   |   |   |   | E |   | T. microphylla 1,5% |                   |   |   | L | M |
| T. garganica 6%   |                   |   |   |   |   | F | C. arabica 6%       |                   |   |   | L | M |
| T. microphylla 6% |                   |   |   |   |   | G | C. arabica 3%       |                   |   |   | L | M |
| T. garganica 3%   |                   |   |   |   |   | G | Ethanol             |                   |   |   | L | M |
| A. campestris 6%  | H                 |   |   |   |   |   | T. hirsuta 1,5%     |                   |   |   |   | M |
| T. garganica 1,5% |                   | I |   |   |   |   | C. arabica 1,5%     |                   |   |   |   | M |
| T. hirsuta 6%     |                   | I | J |   |   |   | Témoïn              |                   |   |   |   | M |

- *P. medicaginis var. pinodella*

| TRAITEMENTS       | GROUPES HOMOGENES |   |   |   |   |   | TRAITEMENTS         | GROUPES HOMOGENES |   |   |
|-------------------|-------------------|---|---|---|---|---|---------------------|-------------------|---|---|
| A. alba 6%        | A                 |   |   |   |   |   | T. hirsuta 3%       | K                 |   |   |
| P. harmala 6%     |                   | B |   |   |   |   | P. harmala 1,5%     | K                 |   |   |
| P. harmala 3%     |                   |   | C |   |   |   | A. alba 1,5%        | K                 | L |   |
| A. alba 3%        |                   |   |   | D |   |   | A. campestris 1,5%  |                   | L | M |
| L. arabicum 6%    |                   |   |   | D | E |   | L. arabicum 1,5%    |                   | L | M |
| T. garganica 6%   |                   |   |   |   | E | F | T. hirsuta 1,5%     |                   | L | M |
| L. arabicum 3%    |                   |   |   |   |   | F | T. microphylla 1,5% |                   | L | M |
| A. campestris 6%  |                   |   |   |   |   |   | G                   | C. arabica 6%     |   | M |
| T. microphylla 6% | H                 |   |   |   |   |   |                     | Ethanol           |   | M |
| T. microphylla 3% |                   | I |   |   |   |   |                     | T. garganica 1,5% |   | M |
| T. hirsuta 6%     |                   | I |   |   |   |   |                     | C. arabica 3%     |   | M |
| A. campestris 3%  |                   | I |   |   |   |   |                     | C. arabica 1,5%   |   | M |
| T. garganica 3%   |                   |   | J |   |   |   |                     | Témoin            |   | M |

- *A. pisi*

| TRAITEMENTS       | GROUPES HOMOGENES |   |   |   |   |   | TRAITEMENTS         | GROUPES HOMOGENES |                 |   |
|-------------------|-------------------|---|---|---|---|---|---------------------|-------------------|-----------------|---|
| P. harmala 6%     | A                 |   |   |   |   |   | T. garganica 3%     | I                 |                 |   |
| A. alba 6%        | A                 |   |   |   |   |   | T. microphylla 3%   | I                 |                 |   |
| P. harmala 3%     |                   | B |   |   |   |   | T. microphylla 1,5% |                   | J               |   |
| A. alba 3%        |                   |   | C |   |   |   | A. alba 1,5%        |                   | J               |   |
| A. campestris 6%  |                   |   |   | D |   |   | T. hirsuta 1,5%     |                   |                 | K |
| P. harmala 1,5%   |                   |   |   |   | E |   | L. arabicum 1,5%    |                   |                 | K |
| L. arabicum 6%    |                   |   |   |   | E |   | T. garganica 1,5%   |                   |                 | K |
| T. garganica 6%   |                   |   |   |   | E |   | A. campestris 1,5%  |                   |                 | K |
| A. campestris 3%  |                   |   |   |   |   | F | C. arabica 3%       |                   |                 |   |
| T. hirsuta 6%     |                   |   |   |   |   |   | G                   | Ethanol           |                 |   |
| T. hirsuta 3%     |                   |   |   |   |   |   | G                   | H                 | C. arabica 6%   |   |
| L. arabicum 3%    |                   |   |   |   |   |   | G                   | H                 | C. arabica 1,5% |   |
| T. microphylla 6% |                   |   |   |   |   |   | H                   |                   | Témoin          |   |

**Annexe 13** : Comparaison des moyennes de la durée d'incubation des pathogènes.

- *A. rabiei/pois chiche*

| TRAITEMENTS     | GROUPES HOMOGENES |   |   |   |   |
|-----------------|-------------------|---|---|---|---|
| P. harmala 6%   | A                 |   |   |   |   |
| P. harmala 3%   |                   | B |   |   |   |
| A. alba 6%      |                   |   | C |   |   |
| A. alba 3%      |                   |   |   | D |   |
| P. harmala 1,5% |                   |   |   |   | E |
| A. alba 1,5%    |                   |   |   |   | E |
| Ethanol         |                   |   |   |   | E |
| Témoin          |                   |   |   |   | E |

- *Le complexe ascochyta/pois*

| TRAITEMENTS     | GROUPES HOMOGENES |   |   |   |   |
|-----------------|-------------------|---|---|---|---|
| P. harmala 6%   | A                 |   |   |   |   |
| A. alba 6%      |                   | B |   |   |   |
| P. harmala 3%   |                   |   | C |   |   |
| A. alba 3%      |                   |   |   | D |   |
| P. harmala 1,5% |                   |   |   |   | E |
| Ethanol         |                   |   |   |   | E |
| A. alba 1,5%    |                   |   |   |   | E |
| Témoin          |                   |   |   |   | E |

**Annexe 14** : Comparaison des moyennes de la durée de latence des pathogènes.

- *A. rabiei/pois chiche*

| TRAITEMENTS     | GROUPES HOMOGENES |   |   |  |   |
|-----------------|-------------------|---|---|--|---|
| P. harmala 6%   | A                 |   |   |  |   |
| A. alba 6%      |                   | B |   |  |   |
| P. harmala 1,5% |                   |   | C |  |   |
| Ethanol         |                   |   | C |  |   |
| A. alba 1,5%    |                   |   | C |  |   |
| Témoin          |                   |   | C |  |   |
| P. harmala 3%   |                   |   |   |  | D |
| A. alba 3%      |                   |   |   |  | D |

- *Le complexe ascochyta/pois*

| TRAITEMENTS     | GROUPES HOMOGENES |   |   |  |   |
|-----------------|-------------------|---|---|--|---|
| P. harmala 6%   | A                 |   |   |  |   |
| A. alba 6%      |                   | B |   |  |   |
| P. harmala 3%   |                   |   | C |  |   |
| A. alba 3%      |                   |   | C |  | D |
| P. harmala 1,5% |                   |   |   |  | D |
| A. alba 1,5%    |                   |   |   |  | D |
| Ethanol         |                   |   |   |  | D |
| Témoin          |                   |   |   |  | D |

