

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Centre Universitaire - Salhi Ahmed - Nâama

Institut des Sciences et de Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Laboratoire de recherche :

Gestion durable des ressources naturelles dans les zones arides et  
semi-aride

## MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de

**MASTER Académique**

En Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté Par :

- AOURAGH Asma.
- BELABED Hadjer.
- TOUMI Hanane.

### Thème

---

Caractérisation phénotypique des isolats  
*d'Ascochyta pisi* et étude de l'inhibition de  
leur activité amylolytique par l'huile  
essentielle de *Juniperus phoenicea*

---

Soutenu le :

Devant le jury :

**Président :** M<sup>r</sup>. MAROUF.A

Professeur, Centre Universitaire de Naama

**Examineur :** M<sup>me</sup>. LAGHA.N

M.C.A, Centre Universitaire de Naama

**Encadreur :** M<sup>me</sup>. YAKOUBI.M

M.C.B, Centre Universitaire de Naama

**Année universitaire : 2021 / 2022**



# Remerciement

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿قالوا سبحانك لا علم لنا الا ما علمتنا انك انت العليم الحكيم﴾ سورة البقرة 36

*Toute notre gratitude et tous nos remerciements les plus sincères à "الله" le tout puissant de nous avoir donné la chance d'exaucer notre rêve d'avoir réussie dans nos études avec succès dès le départ et jusqu' aujourd'hui et qui nous a donné la force et la volonté d'élaborer ce modeste travail.*

*Nous tenons à remercier chaleureusement notre encadreur Madame YAKOUBI.Meryem, d'avoir accepté de nous encadrée, orienter et pour nous avoir permis de bénéficier de ces conseils et la confiance qu'elle nous a accordée pour la réalisation de ce travail .*

*Au professeur MAROUF.Abdrezzak,d'avoir accepté de présider notre jury pour évaluer notre travail.*

*Vos qualités scientifiques et votre intérêt pour la recherche sont pour nous une source de motivation supplémentaire pour la suite de notre carrière. Recevez ici, toute notre gratitude et toute notre sincère reconnaissance pour votre disponibilité.*

*Nous remercions très chaleureusement Madame LAGHA.Nouria, d'avoir accepté d'évaluer notre travail pour l'intérêt qu'elle a porté à notre mémoire et*

*D'être un honorable membre de jury.*

*Notre respect et nos vifs remerciements vont à notre invités le professeur AMROUCHE.Abdelilah, et le professeur GHERIB. Mohammed, pour ses riches et précieux conseils.*

*Nos remerciements s'adressent à toute l'équipe du laboratoire de microbiologie et de biochimie, pour leur gentillesse et conseils.*

*Enfin ; nos remerciements s'adressent à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.*



# Dédicace

*Je dédie ce travail*

*A mon très cher père pour l'amour et tendresse qu'il m'a toujours donnée, leur encouragement, sacrifices et toute l'aide qu'il m'a apportée durant mes études. Puisse dieu leur accorder santé bonheur et longue vie.*

*A mon adorable grande sœur **Fatiha** et ma princesse **Chaima** pour ces encouragements et prière.*

*A mon formidable belle-mère **Amina** et mes chers frères **Bouamama** et **Ahmed**.*

*A la mémoire de ma très chère mère **رحمها الله ودا سكتها فسيح جنته***

*A mes petits bijoux, **Rihana**, **Insaf** et **Monsif***

*A ma très tante **Aicha** et tout la famille : **Houragh**, **Belabed**, **Bendjedid** et **Toumi**.*

*A mes belles, **Hanane** et **Hadjer** pour son soutien moral, patience et compréhension toute longue de ce projet.*

*Sans oublier mes chères amis, **Latifa**, **Saliha**, **Wafaa**, **Naima**, **Chahira**,*

***Chahrazed**, **Houda**, **Hadjer** et **Soumia***

*Asma*



# Dédicace

*A ma chère mère **Houaria***

*Aucune dédicace très chère maman, ne pourrait exprimer la profondeur des sentiments que j'éprouve pour vous... Affable, honorable, : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Puisse Dieu le tout puissant te protéger du mal, te procurer longue vie, santé et bonheur afin que je puisse te rendre un minimum de ce que je te dois.*

*A mon très cher père **Djelloul***

*Vous avez toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir et d'amour.*

*Vous êtes la lumière qui illumine mon chemin.*

*Ce travail est le résultat de l'esprit de sacrifice dont vous avez fait preuve, de l'encouragement que vous ne cessez de manifester, j'espère que vous y trouverez les fruits de votre semence. J'implore Dieu, tout puissant, de vous accorder une bonne santé, une longue vie et beaucoup de bonheur.*

*A mes adorables sœurs*

***Fatima Zohra** tu comptes énormément pour moi, je n'oublierais jamais ton encouragement et ton soutien le long de mes études, que dieu la protège pour ton mari **Omar** et vos enfants,*

*La joyau brillante **Soudjoud**, **Abdeldjalil** et **Firdaous***

*Et la petite, **Zineb**. Je te souhaite une vie pleine de bonheur.*

*A mes frères **Ismail** (ses fils **Ishak**, **Haroun**) ; **Mouhammed** et **Ayyoub**, et toute*

*La famille **Belabed** et **Bouchareb***

*A mes chers trinôme **Asma** et **Hanane** et leurs familles, on a passé des bons moments ensemble*

*A mes chères amies **Naima**, **Wafa**, **Ahlem**, **Marwa**, **Wiam***

***Manel**, **Wafaa**, **Hadjer** et **Saida***

*Et tout ce qui m'ont aidé moralement*

***Hadjer***



# Dédicace

*Je tiens c'est grande plaisir que je dédie ce modeste travail*

*A ma mère Fatiha pour son amour, ses encouragements et ses sacrifices*

*A mon père Ahmed pour son soutien, son affection et la confiance qu'il m'a  
accordé*

*A ma chère grand-mère à qui je suis souhaité une longue vie en bonne santé.*

*A ma chère sœur Meryam pour leur encouragement et sa princesse Anfel*

*A mes chère frères, Mohammed, Ibrahim et Ismail.*

*A mes Belle-sœur Fatima Zohra et Fatima et sa filles Aya et Khouloud*

*A ma tante Dabbia et ses filles, Nawal, Sara, Asma Kaouther*

*A mes petits bijoux : Siradj et Ishak.*

*A tous les membres de la famille : Toumi, Houragh, Belabed et Kalla.*

*A mes chers trinômes : Asma et Hadjer qui m'ont donné la souris dans les  
moments difficiles.*

*A tous mes chers amis :*

*Hadjer, Wafaa, Chahira, Naima, Somia, Hafida, Chahrazed,*

*Houda, Hanane, Halima, Ikram, Souad et Sara.*

*Et tous ceux qui m'aiment.*

*Hanane*



## *Résumé*

Notre travail porte sur l'étude du champignon phytopathogène *Ascochyta pisi* Lib. agent causal de l'antracnose de pois, qui est l'une des maladies fongiques transmissibles par les semences, provoquant des lésions nécrotiques sur la partie aérienne de la plante adulte de petits pois (*Pisum sativum* L.). En effet, cet agent pathogène possède également une forte propriété enzymatique très puissante qui contribue à sa pathogénicité, notamment l'amylase.

Six (06) souches d'*Ascochyta pisi* collectées de différentes régions Algériennes, ont été isolées à partir des gousses de pois présentant les symptômes de l'antracnose, purifiées puis identifiées par caractérisation morphologique.

La détermination de l'activité amylolytique sur milieu solide (Czapeck modifié avec différentes concentrations d'amidon), montre que le plus forte concentration d'amidon (Czapeck+ amidon à 2 %) donne une bonne croissance pour les six (06) isolats aux différents PH (4,6,8) de milieu, où elles ont révélé un pic d'activité amylolytique à un PH égale à 6. Alors que l'activité amylolytique dans les filtrats de culture des six isolats a été estimée par la méthode de cup-plate « cylinder plate method », qui a confirmé la présence d'un complexe enzymatique dans les filtrats de culture nécessaire pour hydrolyse l'amidon soluble dans le milieu.

La lutte biologique contre l'agent pathogène *Ascochyta pisi* Lib. par les huiles essentielles présente une alternative biologique utilisée dans ce travail. Cette alternative consiste à extraire l'huile essentielle à partir des feuilles sèches de *Juniperus phoenicea* par la méthode d'hydrodistillation qui a donné un rendement de 0,39%. L'activité antifongique d'HE de *J. phoenicea* sur la croissance mycélienne et l'activité amylolytique est réalisé par la méthode de contact directe sur la gélose avec des différentes concentrations d'huile (41,5 ; 42,5 ; 43 µL /mL). Les résultats montrent que l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* possède un effet sur la croissance mycélienne et l'activité amylolytique, traduit par une inhibition modérée à des concentrations de 41,5/42,5µL/mL et une inhibition totale à la concentration 43µL/mL.

**Mots Clés :** *Pisum sativum*. L, *Ascochyta pisi* Lib, l'antracnose, activité amylolytique, lutte biologique, activité antifongique, huile essentielle, *Juniperus phoenicea*.

## *Abstract*

Our work focuses on the study of a plant pathogen fungus *Ascochyta pisi* Lib causal agent of pea anthracnose, which is one of the fungal diseases transmissible by seeds, causing necrotic lesions on different organs of pea plant (*Pisum sativum* L.). Indeed, this pathogen has a very powerful enzymatic property that contributes to its pathogenicity, particularly amylase.

Six *Ascochyta pisi* strains collected from different regions of Algeria, were isolated from pea pods presenting the symptoms of the anthracnose, purified and identified by morphological characterization.

Determination of amylolytic activity on solid medium (modified Czapeck with different starch concentrations); shows that the highest starch concentration (Czapeck+ starch at 2%) gives good growth for the six (06) isolates at different pH (4,6,8) medium, where they revealed an optimum amylolytic activity at a pH equal to 6. While the amylolytic activity in culture filtrates of the six isolates was estimated by the cup-plate method or « cylinder plate method », which confirmed the presence of an enzymatic complex in culture filtrates necessary for the hydrolysis of starch soluble in the medium.

The bio-control of the pathogenic agent *Ascochyta pisi* Lib by essential oils is a biological alternative used in this work consists in extracting the essential oil from the dry leaves of *Juniperus phoenicea* by the method of hydrodistillation which gave a yield of 0,39%. The antifungal activity of *J. phoenicea* HE on mycelial growth and amylolytic activity is achieved by the method of direct contact on agar with different concentrations of oil (41, 5; 42,5; 43 $\mu$ L/mL). The results show that the essential oil of *Juniperus phoenicea* has an impact on mycelial growth and amylolytic activity resulting in moderate inhibition at 41.5; 42.5  $\mu$ L/mL and total inhibition at 43  $\mu$ L/mL.

**Keywords:** *Pisum sativum* L, *Ascochyta pisi* Lib, anthracnose, amylolytic activity, Bio-control, antifungal activity, essential oil, *Juniperus phoenicea*.

## ملخص

يتمحور هذا العمل على دراسة فطر *Ascochyta pisi* Lib المسبب لمرض الانتركنوز لدى نبات الجلبان *Pusim sativum*، حيث يعتبر هذا الأخير أحد الامراض الفطرية التي تنتقل عن طريق البذور مخلقة بقع جذرية على مختلف اعضاء نبات الجلبان. في الواقع يتمتع هذا الفطر المرضي بخاصية انزيمية جد قوية تساهم في قدرته على الامراض نذكر منها: انزيم الاميلاز .

سنة عزلات من *Ascochyta pisi* تم جمعها من مناطق مختلفة من الجزائر، ثم عزلها انطلاقا من قرون نبات الجلبان المصاب بأعراض الانتركنوز. بعد ذلك القيام بتصنيفها ووصفها على اساس خصائصها المورفولوجية.

تحديد النشاط الاميلوزي في الوسط Czapeck (متعدد التراكيز من النشاء) يبين ان اعلى تركيز للنشاء (Czapeck + نشاء 2%) يعطي نموا جيدا للعزلات الست (06) عند درجات حموضة متعددة (4-6-8) للوسط، حيث تبين ان النشاط الاميلوزي الامثل يكون عند درجة حموضة تساوي 6. وان النشاط الاميلوزي في الرشحات المستخرجة من وسط النمو لفطري للعزلات الستة اكدت وجود مجمع انزيمي ضروري لتحليل النشاء القابل للذوبان في الوسط بطريقة cup-plate او « cylender plate method ».

تم استخدام الزيوت الأساسية كبديل بيولوجي للتحكم الحيوي في العامل المرضي *Ascochyta pisi*، حيث استخلص الزيت العطري من الأوراق الجافة لنبات العرعر الفينيقي عن طريق التقطير المائي، الذي اعطى انتاج بنسبة 0.39%. يتم التحقق من نشاط الزيت الأساسي على نمو الفطر ونشاط الاميلوز من خلال التلامس المباشر مع الاجار بتراكيز مختلفة من الزيت 42.5, 41.5 و 43 ميكرو لتر/مل. تظهر النتائج ان لزيت العرعر الفينيقي تأثير على النمو والنشاط الأميلوزي ينتج عنه تثبيط جزئي عند التراكيز 42.5, 41.5 ميكرو لتر/مل وتثبيط كلي عند التركيز 43 ميكرو لتر/مل.

**كلمات مفتاحية:** *Ascochyta pisi* Lib ، *Pisum sativum* L ، انتركنوز، نشاط الاميلوزي، التحكم الحيوي، الزيت الاساسي، العرعر الفينيقي.

## *Table des matières*

Remerciement.....	I
Dédicace.....	II
Résumé.....	III
Abstract.....	IV
ملخص.....	V
Introduction.....	1

### *Synthèse bibliographique*

<b>I. La plante « petit pois » :.....</b>	<b>3</b>
I.1. Description botanique :.....	3
I.1.1. Morphologie de rhizosphère : .....	3
I.1.2. Morphologie de phyllosphère : .....	3
I.2. Origine et historique :.....	4
I.3. Etymologie : .....	5
I.4. Position systématique : .....	5
I.5. Composition biochimique et valeur nutritionnel du petit pois : .....	5
I.6. Production de petit pois : .....	6
I.6.1. Production mondiale : .....	6
I.6.2. Production en Algérie : .....	7
I.7. Les maladies et les ravageurs du petit pois : .....	7
I.7.1. Les maladies :.....	7
I.7.2. Les ravageurs : .....	9
<b>II. Etude de l'agent pathogène (<i>Ascochyta pisi</i>) :.....</b>	<b>10</b>
II.1. Anthracnose :.....	10
II.2. Historique de la taxonomie :.....	10
II.3. Position systématique :.....	11
II.4. Description morphologique : .....	11
II.4.1. Caractères macroscopiques : .....	11
II.4.2. Caractères microscopiques : .....	12
II.5. Gamme d'hôte et symptomologies :.....	13
II.5.1. Gamme d'hôte : .....	13
II.5.2. Symptomologies :.....	13
II.6.1. Infection primaire : .....	14

II.6.2. Infection secondaire : .....	16
<b>III. Lutte biologique :.....</b>	<b>17</b>
III.1. Généralité sur les huiles essentielles :.....	18
III.2. Composition des huiles essentielles.....	18
III.3. Mode d'action des huiles essentielles .....	20
III.4. Méthodes d'extraction .....	21
III.4.1. Extraction par expression à froid.....	21
III.4.2. Hydro-diffusion .....	22
III.4.3. Hydrodistillation.....	22
<b>IV. Présentation de la plante étudiée : .....</b>	<b>23</b>
IV.1. Position taxonomique.....	23
IV.2. Description botanique .....	23
IV.3. Propriétés thérapeutiques .....	24
IV.4. Composition chimique d'huile essentielle de <i>Juniperus phœnicea</i> .....	24

## Matériel et méthodes

<b>I. Matériel fongique : .....</b>	<b>26</b>
I.1. Échantillonnage .....	26
I.2. Isolement et purification des champignons .....	26
I.2.1. Méthode d'isolement .....	26
I.2.2. Méthode de Purification .....	27
<b>II. Identification des isolats : .....</b>	<b>28</b>
II.1. Etude macroscopique.....	28
II.2. Etude microscopique .....	28
<b>III. Conservation des isolats :.....</b>	<b>29</b>
<b>IV. Mesure de la croissance mycélienne :.....</b>	<b>29</b>
<b>V. Etude de l'activité amylolytique : .....</b>	<b>30</b>
V.1. Les amylases.....	30
V.2. Recherche des activités amylolytique sur milieux solides .....	31
V.3. Effet de variation de pH sur la croissance mycélienne.....	31
V.4. Optimisation de la croissance et de l'activité amylolytique sur milieu liquide.....	32
V.5. Mise en évidence de l'activité amylolytique par la méthode cup-plate .....	32
<b>VI. L'essai <i>in vitro</i> de la lutte biologique : .....</b>	<b>33</b>
VI.1. La collecte de la plante médicinale .....	33

VI.2.	L'extraction des huiles essentielles.....	33
VI.3.	Calcul du rendement .....	34
VI.4.	Activité antifongique <i>in vitro</i> de l'HE.....	35

## **Résultats et discussion**

<b>I.</b>	<b>Matériel fongique : .....</b>	<b>37</b>
I.1.	Isolement : .....	37
<b>II.</b>	<b>Identification des isolats : .....</b>	<b>37</b>
II.1.	Etude macroscopique : .....	38
II.2.	Etude microscopique : .....	40
<b>III.</b>	<b>Etude de l'activité amylolytique : .....</b>	<b>41</b>
III.1.	Recherche de l'activité amylolytique sur milieux solides : .....	41
III.2.	Effet de variation du pH sur la croissance mycélienne et l'activité amylolytique : .....	43
III.3.	Optimisation de la croissance mycélienne et de l'activité amylolytique sur milieu liquide : .....	45
III.3.1.	Mise en évidence de l'activité amylolytique par la méthode cup plate : .....	46
<b>IV.</b>	<b>Évaluation <i>in vitro</i> de l'activité antifongique et anti enzymatique d'huile essentielle :.....</b>	<b>49</b>
IV.1.	Calcul du rendement : .....	49
IV.2.	Effet des huiles essentielles sur la croissance mycélienne et l'activité amylolytique : .....	49
	<b>Conclusion.....</b>	<b>55</b>
	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>56</b>

## ***Liste des abréviations***

**%** : Pour cent.

**°C** : Degré Celsius.

**µL** : Micro litre.

**µm** : Micro mètre.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARN** : Acide ribonucléique

***A.pisi*** : *Ascochyta pisi*

**ATP** : Adénosine triphosphate

**CLA** : Camation Leaf Agar.

**cm** : Centimètre.

**CMI** : concentration maximale d'inhibition.

**CPG-DIF** : Chromatographie en Phase Gazeuse - Détecteur à Ionisation de Flamme

**Cz**: Czapeck.

**g**: gramme.

**Ha**: Hectare.

**HEs** : Huiles essentielles.

***J. phoenicea*** : plante médicinale appelée *Juniperus phoenicea*.

**mL** : millilitre.

**mm** : millimètre.

**PDA** : milieu pomme de terre dextrose agar.

**pH** : Potentiel d'hydrogène.

**5S + 5P + (9+1) E + 1C** : 5 Sépales + 5 Pétales + (9+1) Etamines + 1Carpelle

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**SM** : Spectrométrie de Masse

**V/V** : volume par volume

## *Liste des figures*

<b>Figure 1:</b> Petit pois ( <i>Pisum sativum</i> L.) et leur différentes parties.....	4
<b>Figure 2:</b> valeur nutritionnel de petit pois pour 100g.....	6
<b>Figure 3:</b> Colonie d' <i>Ascochyta pisi</i> sur PDA (E : recto et F : verso).....	12
<b>Figure 4:</b> Morphologie des organes sexée et asexée chez <i>Ascochyta pisi</i> .....	12
<b>Figure 5:</b> symptomologie de l'antracnose sur: A ; les feuilles, B; les tiges, C; les gousses et D; les graines.....	14
<b>Figure 6:</b> Cycle de vie d'antracnose du pois.....	15
<b>Figure 7:</b> Formule de l'isoprène (Fillatre, 2011).....	19
<b>Figure 8:</b> Différentes parties de la plante de <i>Juniperus phoenicea</i> .....	24
<b>Figure 9:</b> Échantillons de gousses de petit pois présentant les symptômes d'antracnose .....	26
<b>Figure 10:</b> Isolement du champignon à partir des gousses. ....	27
<b>Figure 11:</b> Méthode d'identification CLA. ....	29
<b>Figure 12:</b> Mesure de diamètre de colonie .....	29
<b>Figure 13:</b> Feuilles de <i>Juniperus phoenicea</i> .....	33
<b>Figure 14:</b> Hydrodistillateur de types clevenger .....	34
<b>Figure 15:</b> Isolement du champignon à partir des gousses, (A: Recto, B: Verso).....	37
<b>Figure 16:</b> Aspect macroscopique d' <i>Ascochyta pisi</i> . ....	39
<b>Figure 17:</b> Aspect microscopique d' <i>Ascochyta pisi</i> sur milieu PDA et CLA.....	40
<b>Figure 18:</b> Les moyennes de la croissance mycélienne des 06 isolats d' <i>Ascochyta pisi</i> sur trois milieux ( Czapeck +amidon 1% / Czapeck +amidon 2% /Czapeck +glucose 2%) .....	42
<b>Figure 19:</b> L'activité amylolytique des isolats sur milieu czapeck +amidon 2%.....	43
<b>Figure 20:</b> l'activité amylolytique des isolats sur milieu czapack +amidon 1% .....	43
<b>Figure 21:</b> les zones de lyse après l'addition de lugol (czapeck +amidon 2%).....	43
<b>Figure 22:</b> les zone de lyse après l'addition de lugol (czapeck +amidon 1%) .....	43
<b>Figure 23:</b> L'effet de différente pH sur la croissance mycélienne et l'activité amylolytique. ....	44

<b>Figure 24:</b> Effet du variation de pH sur la croissance mycélienne et l'activité amylolytique.....	44
<b>Figure 25:</b> Apparence de zone de lyse par la méthode de cup-plate.....	46
<b>Figure 26:</b> Diamètres en cm des zones de lyse (filtrats de culture du milieu Cz +Amidon 2 à pH=06). .....	46
<b>Figure 27:</b> Huile essentiel de <i>Juniperus phoenicea</i> .....	49
<b>Figure 28:</b> Effet des huiles essentielles sur la croissance mycéliennes d' <i>Ascochyta pisi</i> . .....	50
<b>Figure 29:</b> Effet des huiles essentielles sur l'activité amylolytique .....	51
<b>Figure 30:</b> Lyse au niveau du mycélium d' <i>Ascochyta pisi</i> en présence d'huile essentielle de <i>J. phoenicea</i> à 41.5µl/ml (GX1000) .....	30

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1:</b> les pays producteurs de petit pois dans le monde (pois frais) (FAOSTAT, 2021) .	6
<b>Tableau 2 :</b> les maladies, l'agent causal et les symptômes sur plante de petit pois .....	7
<b>Tableau 3:</b> les composants majeurs d'huile essentiel de <i>Juniperus phœnicea</i> .....	25
<b>Tableau 4 :</b> Origine et dates de prélèvement des échantillons. ....	38
<b>Tableau 5 :</b> Les caractères macroscopique des isolats. ....	38
<b>Tableau 6:</b> le poids de la biomasse fongique. ....	45

## *Liste des annexes*

<b>Annexe 1:</b> Composition des milieux de culture.....	73
<b>Annexe 2 :</b> recherche de l'acticité amylolytique sur différentes milieux .....	75
<b>Annexe 3 :</b> Effet de variation du pH sur la croissance mycélienne et l'activité amylolytique .	77
<b>Annexe 4:</b> Mise en évidence de l'activité amylolytique par la méthode cup plate .....	79
<b>Annexe 5:</b> Cinétique de la croissance.....	80

Le pois (*Pisum sativum* L.) est une plante légumineuse, appartenant à la famille des *Fabacées* cultivée dans le monde entier. Cette plante forme une source nutritionnelle très importante précieuse pour la consommation humaine et l'alimentation animale.

En Algérie, les conditions climatiques et le sol sont très propices à sa culture, laquelle a marqué une production de 131 414 tonnes en 2017 (FAO, 2017). Les principales wilayas productrices sont : Biskra, Mascara, Boumerdes, Mostaganem et Tlemcen.

Comme toutes les plantes cultivées, la culture de pois est exposée à l'attaque d'une large gamme des agents pathogènes comprenant les champignons, les bactéries, les virus et les ravageurs. Parmi les maladies fongiques en Algérie, l'antracnose de pois causé par *Ascochyta pisi*. Ce champignon phytopathogène affecte la partie aérienne de pois et leurs symptômes apparaissent sous forme de taches nécrotiques brunes et peut entraîner une perte de rendement de 50 à 75% lorsque les conditions sont favorables (Wallen, 1974).

La lutte chimique par les fongicides est la méthode la plus couramment utilisée pour le contrôle de ce pathogène, cependant l'emploi intensif et aléatoire a causé des problèmes de pollution résiduelles et un déséquilibre environnemental, ainsi que le problème de résistance microbienne (Kasmi et al., 2018). Pour cela plusieurs chercheurs ont proposé une alternative de lutte biologique par les huiles essentielles en raison de leurs non phytotoxicité et biodégradabilité.

La composition chimique des HE est responsable de ses propriétés antimicrobienne (Baka et Rashad, 2016) plus particulièrement leur activité antifongique (Hu et al., 2007 ; Bakkali et al., 2008 ; Lang et Buchbauer, 2012).

L'Algérie est caractérisée par une richesse et une biodiversité de la flore aromatique utilisée comme des herbes à fins thérapeutiques, à cet effet nous sommes intéressés à valoriser notre flore locale de la wilaya de Naama par le choix de la plante de *Juniperus phœnicea*.

Notre objectif de travail est d'isoler des souches d'*Ascochyta pisi*, les caractériser, mise en évidence de l'activité amyolytique et évaluer l'activité antifongique *in vitro* d'huile essentielle de *Juniperus phœnicea*.

Nous avons organisé notre manuscrit en trois grandes parties :

La 1<sup>re</sup> partie est une synthèse bibliographique qui est consacré à la description bibliographique relative à *Pisum sativum*, *Ascochyta pisi*, et la lutte biologique par l'huile essentielle de *J. phœnicea*.

La 2<sup>ème</sup> partie est réservée à la partie expérimentale qui consiste à l'isolement, la purification et l'identification morphologiques des isolats d'*Ascochyta pisi*, Mise en évidence de l'activité amylolytique, l'extraction d'huile essentielle à partir des feuilles séchées de *Juniperus phœnicea* et l'étude de leur pouvoir antifongique sur les isolats d'*Ascochyta pisi*.

La 3<sup>ème</sup> partie est consacrée aux résultats obtenus et leurs discussions.

Enfin, notre travail est terminé par une conclusion générale mettront en évidence les perspectives de recherche.

## **I. La plante « petit pois » :**

### **I.1. Description botanique :**

Le petit pois est une plante d'origine d'Asie centrale (Afghanistan ; Inde), herbacée, annuelle de famille des *fabacées*, principalement autogamie mais certains cultivars ont un taux d'allogamie peuvent être observables. Ce type de légumineuse dont les qualités nutritives, gustatives et culinaires sont très élevées.

Le petit pois (*Pisum sativum* L.) est une plante grimpante caractérisée par un système aérien peu ramifié d'une longueur de 20 à 150 cm et d'un système racinaire pivotant développée en fonction du type du sol et des conditions.

#### **I.1.1. Morphologie de rhizosphère :**

L'appareil souterrain du petit pois est de type pivotant pouvant atteindre une profondeur d'un mètre dans des conditions favorables du sol mais la couche superficielle du sol est très ramifiée. On peut noter la présence de nodosités qui va permettre à la plante de fixer l'azote atmosphérique. (Carroue et Girad, 1994).

#### **I.1.2. Morphologie de phyllosphère :**

**Tiges** : peu ramifiées ; grêles et creuses ; arrondies ou légèrement anguleuses ; d'une hauteur variable (0.25 à 2 m) ; elles se caractérisent par un certain nombre des nœuds sur les feuilles ou les ramifications ou des mails sur les fleurs. (Carroue et Girad, 1994).

**Feuilles** : les feuilles alternées sont composées de 4 à 6 feuilles sessiles ; opposées ; entières ou plus ou moins dentées ; ovales ou elliptiques et ont de 1.5 à 6 cm de longueur

Les feuilles possèdent à leur base deux grandes stipules, crénelée et arrondies (Cousin ,1996).

**Fleurs** : les fleurs du types « papilionacé » de couleur blanc ou avec l'étendard d'un blanc bleuâtre environ 3 à 4 cm de long, les pédoncules de longueur variable supportent 1 à 3 fleurs (Elzebroek et Wind, 2008). Le calice formé de cinq (05) sépales soudés et présente cinq (05) dents inégales.

La corole compte cinq pétales très différenciés, l'étendard en position postérieure et l'androcée qui comprend dix (10) étamines.

**Diagramme florale** : 5S + 5P + (9+1) E + 1C.

**Fruit** : est une gousse à deux valve, appelée aussi « cosse » de 4 à 11 cm ; contenant de 2 à 10 graines. Ces gousses présentent des variations morphologiques selon les variétés.

**Graine** : ronde, lisses et non marbrées ou anguleuses, protéagineux et riche en amidon.

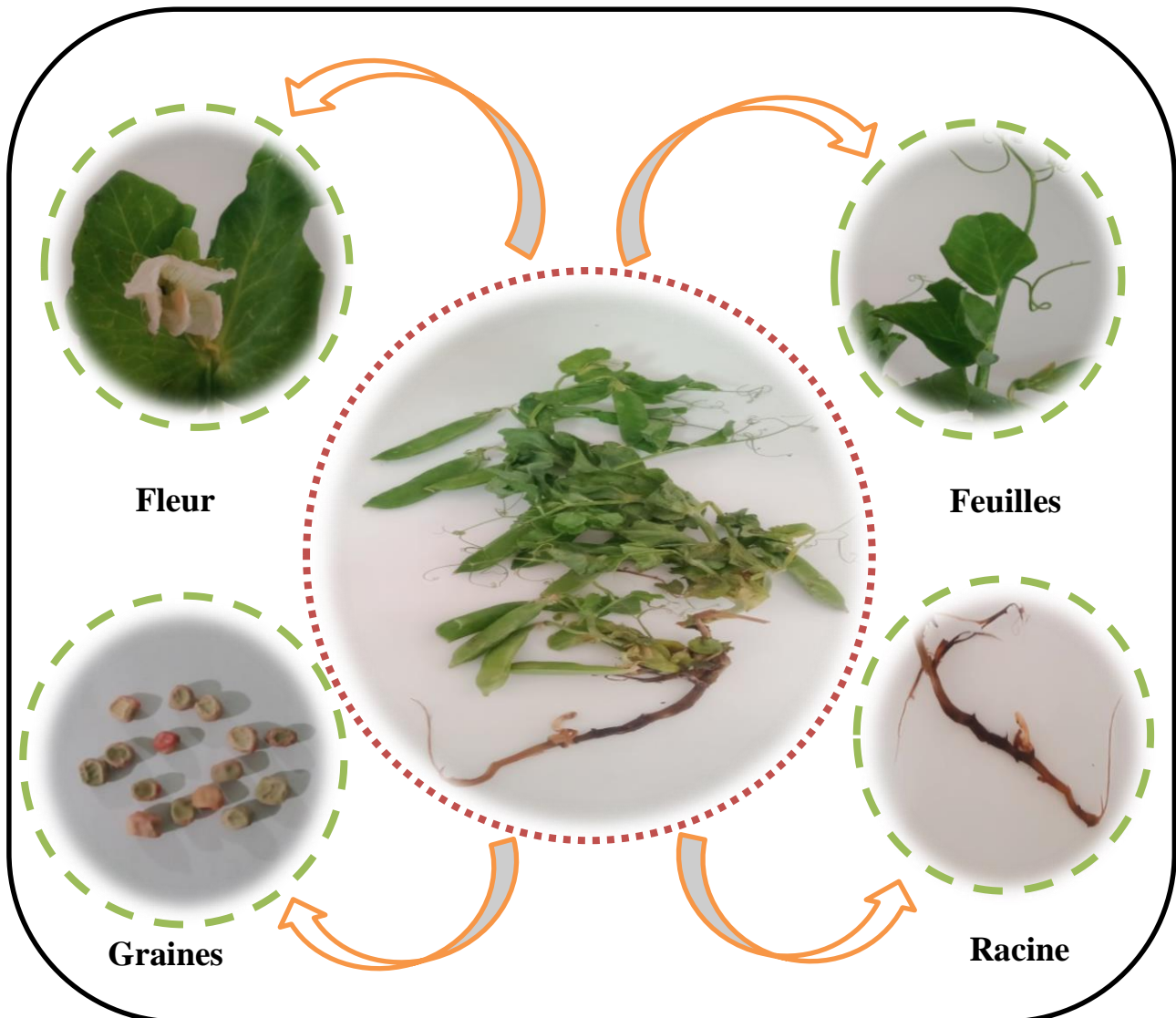


Figure 1: Petit pois (*Pisum sativum* L.) et leurs différentes parties.

## I.2. Origine et historique :

Théophraste, trois siècles avant notre ère, dans son livre intitulé "recherches sur les plantes" a décrit plusieurs espèces de la famille actuelle des légumineuses et notamment "le pois" (Davies *et al.*, 1985).

L'origine et les ancêtres de *Pisum sativum* L. sont mal connus. La région méditerranéenne, l'Asie centrale et occidentale et l'Ethiopie ont été envisagés comme centres d'origine. Récemment, la FAO a désigné l'Ethiopie et l'Asie occidentale comme centre de diversité avec des centres secondaires dans le sud de l'Asie et la région méditerranéenne (Grubben, 2006).

Le petit pois est une plante cultivée depuis l'antiquité accompagnée avec certains céréales (blé, orge) environ 8000 ans dans la région du croissant fertile.

Il est découvert dans des sites archéologiques du néolithique de la Grèce à l'Irac entre 7500 et 5000 ans avant Jésus-Christ des restes provenant soit de plante de cueillette ou domestiquées et aussi dans d'autres sites archéologiques de Troie, en Europe centrale (vers 4000 ans) en Europe occidentale et en Inde (vers 2000 ans) (**Cousin et Bannerot, 1992**) ; par la suite sa culture est diffusée vers l'ouest d'Europe et l'est Inde.

De nos jours sa culture est pratiquée dans cinq continents, particulièrement dans les régions de climat tempéré d'Eurasie et d'Amérique du nord.

### **I.3. Etymologie :**

Le terme « pois » est apparu dans la longue Molière au 12<sup>ème</sup> siècle et son étymologie aurait des racines diverses pour certain auteur, il serait dérivé de « *Pisum* » nom latin ou « pisere » signifiant « casser ».

Selon d'autres, le mot « pois » viendrait du grec « pisis » ou « pesi » qui veut dire (pois séparé de sa gousse).

### **I.4. Position systématique :**

- ❖ La classification botanique de petit pois selon (**Burstin et al., 2020**) est comme suivant :

**Règne :** Plantae (plante).

**Phylum :** Trachéophytes

**Super classe :** Angiospermes

**Classe :** Magnoliopsida (Dicotylédones).

**Ordre :** Fabales.

**Famille :** Fabaceae ou légumineuses.

**Sous famille :** Papilionoidés

**Genre :** *Pisum* L.

**Espèce :** *Pisum sativum* L.

### **I.5. Composition biochimique et valeur nutritionnel du petit pois :**

En raison de sa teneur élevée en protéines, vitamines, minéraux et d'autres nutriments, ainsi que de sa faible teneur en matière grasse, de sa teneur élevée en fibres, son absence de cholestérol et un teneur important des acides tel que l'acide phénolique qui a une activité antioxydant, le pois a été largement utilisé dans l'alimentation humaine et animale **Figure 2**.

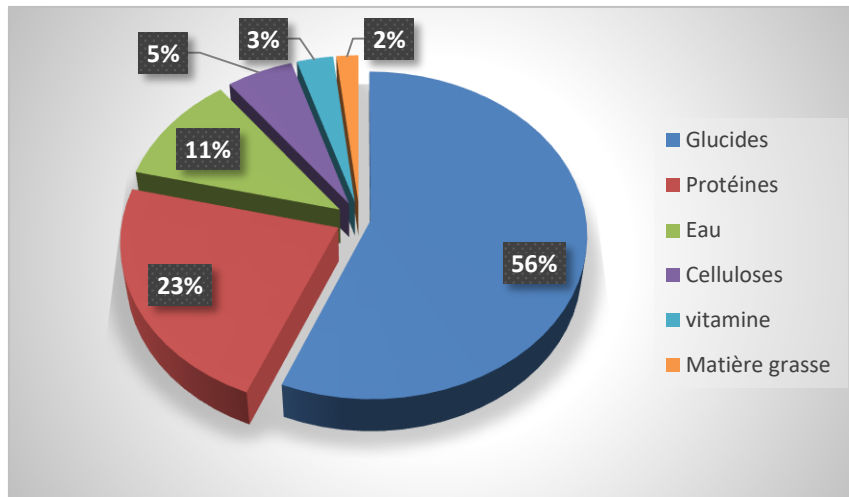


Figure 2: valeur nutritionnel de petit pois pour 100g (Vierling, 2008)

## I.6. Production de petit pois :

Le petit pois parmi les légumineuses les plus cultivées en Algérie et dans le monde entier.

### I.6.1. Production mondiale :

Tableau 1: les pays producteurs de petit pois dans le monde (pois frais) (FAOSTAT, 2021)

pois frais			
Pays	Superficie récoltée (ha)	rendement (hg/ha)	Production (tonnes)
Afrique du sud	1582	21953	3473
Algérie	39542	52959	209409
Belgique	12170	58012	70600
Chine	1400761	80347	11254738
Égypte	523	84706	153233
Éthiopie	18090	61530	3218
France	45510	58321	265420
Inde	563000	101297	5703000
Maroc	14500	66800	96860
Royaume-Uni	42138	37738	159022
Turquie	10961	98980	108492

### I.6.2. Production en Algérie :

La culture de petit pois est répandue dans tous les pays, plus particulièrement dans les plaines côtières et les zones sublittoral (Allard *et al.* 1993). Selon la FAO (2017), la production nationale de pois est établie à 131414 tonnes.

- Les principales wilayas productrices sont : Biskra, Mascara, Boumerdes, Mostaganem et Tlemcen.

### I.7. Les maladies et les ravageurs du petit pois :


Le pois cultivé (*Pisum sativum* L.) peut être affecté soit par des maladies physiologiques dues aux conditions abiotiques (carence du sol, l'inondation et les phénomènes météorologiques), soit par des maladies spécifiques sous l'attaque des agents pathogènes biotiques (bactéries, virus, champignons).

La transmission de ces maladies se fait par diverses voies : par les organismes vivant dans le sol, les semences infectées, les ravageurs (insecte, nématodes) qui créent des blessures favorisant l'arrivée de spores de champignons ou qui inoculent des germes (virus) et par les plantes poussant dans le voisinage ou les restes des précédentes cultures qui peuvent être constitués des sources de contamination (cultures ou plantes sauvages).





#### I.7.1. Les maladies :




Selon (Messiaen *et al.* 1991 ; Chaux et Foury, 1994 ; Brink et Belay, 2006 ; Crosson, 2006 ) les maladies du pois sont résumés dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2** : les maladies, l'agent causal et les symptômes sur plante de petit pois

Maladie	Agent causale	symptômes
Graisse bactérienne de pois 	- <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>psidi</i>	– Des taches grasses sur les organes aériens – L'évoluant des nécroses de couleur brune claire sur les feuilles et brunes sur les gousses.

## Synthèse bibliographique

<p>Viroses du pois</p> 	<p><i>Jaunisse apicale du pois PTYV</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Jaunissement de la partie aérienne des plantes.</li> <li>– Feuilles petites, cassantes et érigées</li> </ul>
<p>L'anthracnose de pois</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>Ascochyta pisi</i></li> <li>– <i>Ascochyta pinodes</i></li> <li>– <i>Ascochyta pinodella</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Des taches circulaires sur les feuilles, les gousses et plus allongées sur les tiges.</li> <li>– Lésions beiges à bordures foncées avec nombreuse ponctuations au centre (pycnides).</li> </ul>
<p>Botrytis ou pourriture grise</p> 	<p>– <i>Botrytis cinerea.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Des pourritures grises sur les feuilles, les tiges et les gousses</li> <li>– Dessèchement des gousses et un mauvais remplissage des grains.</li> </ul>
<p>Mildiou</p> 	<p>– <i>Peronospora viciae.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Jaunissements sur la face supérieure et un duvet gris violacé sur la face inférieure des feuilles</li> <li>– Des taches vert clair à sur les gousses.</li> <li>– des graines tachées ou absentes.</li> </ul>

<p>Oïdium</p> 	<p>– <i>Erysiphe polygoni</i> F.sp. <i>pisi</i></p>	<p>– Un feutrage ras blanc et poudreux colonise les feuilles âgées.</p> <p>– Développement d'un mycélium blanc et pulvérulent sur tous les organes aériens.</p>
<p>Rouille</p> 	<p>– <i>Uromyces pisi.</i></p> <p>– <i>Uromyces viciae craccae.</i></p> <p>– <i>Uromyces viciae fabae.</i></p>	<p>– Des pustules brunes à rousses devenant presque noires sur la face inférieure des feuilles et les tiges.</p>
<p>Sclérotiniose</p> 	<p>– <i>Sclerotinia sclerotiorum</i></p>	<p>– Des sclérotés beiges à noire sur les tiges.</p> <p>– Flétrissement et destruction de la plante entière.</p>

**I.7.2. Les ravageurs :**

- 1) **La cécidomyie** : un diptère qui provoque formation des galles par la production d'une toxine dans les fleurs.
- 2) **Le thrips** : ce sont des minuscules insectes pique la plante au niveau des fleurs et des gousses et dont la larve se développe sur les gousses. Les feuilles sont gonflées et se couvrent de tache jaunes ou brunes elle provoque un dessèchement et un rabougrissement de la plante.
- 3) **Le puceron vert de pois** : pique les feuilles et les stipules pour y prélever la sève qui provoque un affaiblissement des tiges, avortement des boutons floraux et déformation des gousses, il est aussi le vecteur de diverses viroses.
- 4) **Le sitone** : est un charançon de 3.5 à 5 mm de long, entraînent des dégâts aériens et racinaires. Il attaque le limbe des feuilles par la formation des encoches semi-circulaires

sur le bord dont les larves provoquent une destruction des nodosités suivies par une perturbation d'alimentation azotée de rhizosphère.

## **II. Etude de l'agent pathogène (*Ascochyta pisi*) :**

### **II.1. Anthracnose :**

Au cours de ces dernières années, les changements climatiques ont contribué d'une manière significative à la progression des maladies sur les légumineuses et plus particulièrement sur le petit pois. L'anthracnose reste la maladie la plus fréquemment rencontrée pour cette plante. L'anthracnose est un terme d'origine grec signifie : " anthrax"= ulcère et "nose " = maladie provoquée des altérations nécrotiques brunes ou noires (**Bouznad, 1989**), résultant de l'action d'un ou plusieurs champignons *Ascochyta pisi* Lib, *Phoma medicagemis* var. *Pinodella* (Jones) (**Faris-Mokaiesh et al., 1996**).

*Ascochyta* de pois peut envahir les feuilles, les rameaux et les gousses de pois (**Bernard et sabine, 2007**), et causer des dégâts considérables et entraînant une réduction des rendements. (**Furgal-Węgrzycka, 2009**).

### **II.2. Historique de la taxonomie :**

En 1830, **Libert** a décrit le genre *Ascochyta* comme un champignon imparfait appartenant aux Sphaeropsidaceae, ce qui signifie que les spores sont formées à l'intérieur des pycnides. **Allescher (1901)** a montré le genre *Ascochyta* poussant sur les feuilles et le genre *Diplodina west* croissant sur les tiges. Ensuite, **Von Höhnel (1923)** sépare ces deux derniers genres selon la structure des pycnides.

D'après les études de (**Petrak, 1923**) les spores d'*Ascochyta pisi* sont formées par étrangulation d'une cellule du fond de la pycnide, de ce fait il n'y a pas de conidiophores allongés et bien visibles et selon les recherches de (**Labrousse, 1930**) l'extrême variabilité des pycnidiospores tant dans leur forme, dans leur teinte que dans leurs dimensions peut prêter à confusion. Bien qu'habituellement bicellulaires à maturité, elles sont à des stades plus jeunes unicellulaires dans des proportions allant jusqu'à 90 %.

**Sprague et Johnson (1950)**: ont discuté sur la classification infra générique d'*Ascochyta* et ainsi leur position dans les deutéromycètes. Ces chercheurs ont fourni une première clé pour l'identification de 12 *Ascochyta* spp. Basée sur les caractéristiques de forme, longueur et largeur des conidies (**Mel'nik, 2000**).

### II.3. Position systématique :

Le pathogène existe sous deux formes : une forme asexuée (*A.pisi*) et une forme sexuée (*Didymella .pisi*), la reproduction asexuée caractérisée par la présence des pycnides de  $4,2 \times 13,9 \mu$  de dimensions de couleur rosée et de nombre élevé, la reproduction sexuée est caractérisée par la présence des ascospores.

Selon **Aveskamp et al., (2010)**, la classification d'*Ascochyta pisi* est comme suit :

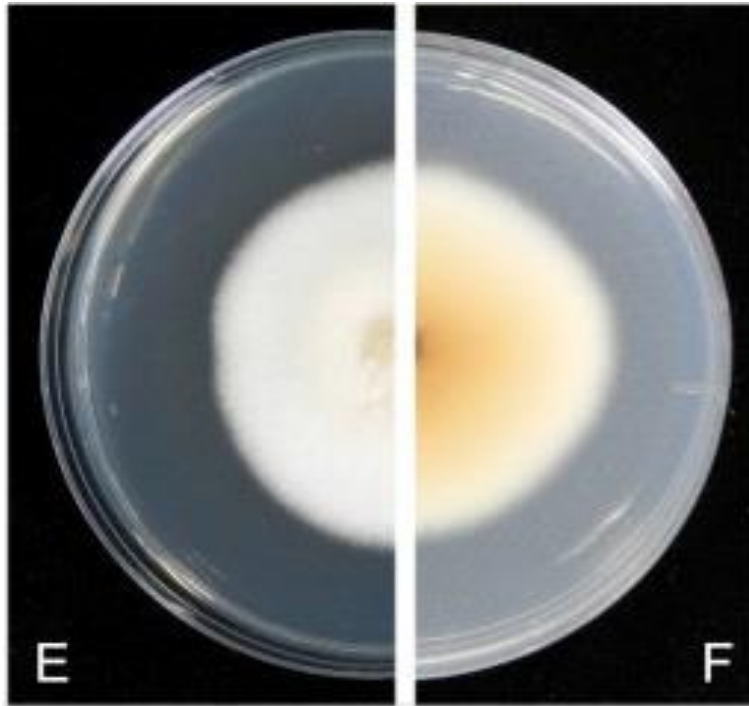
- **Domaine** : Euakryota
- **Règne** : Fungi
- **Phylum** : Ascomycota
- **Subphylum** : Pezizomycotina
- **Class** : Dothideomycetes
- **Sous-classe** : Pleosporomycetidae
- **Ordre** : Pleosporales
- **Famille** : Didymellaceae
- **Genre** : *Ascochyta*
- **Espèce** : *Ascochyta pisi*

### II.4. Description morphologique :

#### II.4.1. Caractères macroscopiques :

L'examen de l'aspect macroscopique des champignons phytopathogènes se fait à l'œil nu, à travers les gousses de petits pois contaminées cultivé sur milieu PDA avec une incubation à 22°C pendant 7 jours à l'obscurité.

- ❖ Les colonies mycéliennes d'*Ascochyta pisi* sont bien différenciées et moins étendues, se développent lentement et mesurent généralement environ 20 et 30 mm de diamètre après une incubation de sept (07) jours, ce diamètre varie selon la vitesse de croissance des souches, le mycélium de champignon est blanc, fin, érigé recouvrant les fragments des gousses contaminées avec une texture duveteuse à cotonneuse. Au revers : les colonies semblent avoir une couleur marron orangé au centre, devenant plus claire vers la périphérie des colonies (**Champion, 1997 ; ISTA, 2008**).

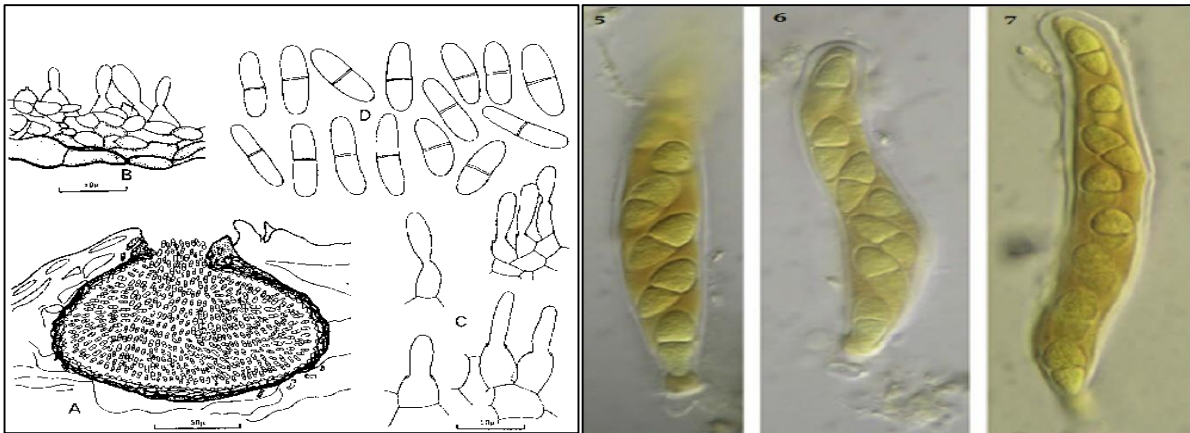


**Figure 3: Colonie d'*Ascochyta pisi* sur PDA (E : recto et F : verso).**

(Chen *et al.*, 2015)

#### **II.4.2. Caractères microscopiques :**

- ❖ **La forme imparfaite** : le stade imparfait du champignon se distingue par la production des pycnides portant des spores. Elles sont épiphyllées jaunes marron, brun pâle à marron foncé, de forme sphérique rarement lenticulaire d'un diamètre de 100-250  $\mu\text{m}$  munies d'un ostiole circulaire de 20 à 30  $\mu\text{m}$  de diamètre, enchâssé dans le tissu foliaire dispersé à travers la zone infectée ou agglomérée sous forme de disque concentrique parfois regroupé en petits groupes ou encore liés les uns aux autres (Mel'nik, 2000).
- ❖ **La forme parfaite** d'*Ascochyta pisi* se distingue par des pseudothèces de forme ronde à irrégulière de 200 à 400  $\mu\text{m}$  de diamètre, de couleur brune à noir avec une ostiole à peine visible, les asques sont bituniés, cylindrique et renfermant linéairement 8 ascospores sont hyalines avec deux (02) cellules inégales au niveau du cloison, arrondies aux deux extrémités, ou avec une (01) extrémité plus aigüe, mesurant 12-17,5  $\times$  6,5-8,5  $\mu\text{m}$  (Chilvers, 2009) **Figure 4.**



**Figure 4 : Morphologie des organes sexuée et asexuée chez *Ascochyta pisi*.**

A : section verticale d'une pycnide.

C : Conidiophore et conidies.

B : partie de la paroi des pycnidiospore et des conidiospores.

D : Conidies.

5,6 et 7 : Asques colorés avec de l'iode.

A, B, C et D (Punithalingam et Holliday, 1972) ; 5,6, 7 :( Chilvers *et al.*, 2009)

## II.5. Gamme d'hôte et symptomologies :

### II.5.1. Gamme d'hôte :

*Ascochyta pisi* a la capacité d'infecter environ 20 genres de plantes et plus de 50 espèces végétales différentes, en Algérie et dans une grande partie de méditerranée, l'agent pathogène préfère s'attaquer le pois.

Les plantes hôtes les plus courantes sont : le pois (*Pisum sativum*), le pois de senteur (*Lathyrus odoratus*), la lentille (*Lens culinaris*), la luzerne (*Medicago sativa*), le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le trèfle (*Trifolium spp*), le soja (*Glycine max*), la fève (*Vicia faba*), et le dolique asperge (*Vigna unguiculata*) (Farr, 2010).

### II.5.2. Symptomologies :

L'antracnose de petit pois peut infecter toutes les différentes parties aériennes de la plante. L'infection primaire des plantules apparaît d'abord sous la forme des taches grises sur les feuilles cotylédonaires, les rameaux ou les gousses, mais se transforme rapidement en lésion brune aux bords foncés. **Figure 5**

#### • Sur les feuilles :

Les premiers symptômes sur les feuilles apparaissent sous forme des nécroses non coalescentes, de couleur brun clair. La partie centrale de la macule représente des pycnides glabres.

- **Sur les tiges :**

L'apparition de la dépression allongée bien délimitée d'un aspect parcheminé.

- **Sur les gousses :**

La présence des petites taches circulaires de couleur brune - ocre bien délimitée à leur surface.

- **Sur les graines :**

Les symptômes d'*A.pisi* apparaissent sur les graines sous forme de mycélium à l'intérieur des téguments, des cotylédons et parfois l'embryon.



**Figure 5:** symptomologie de l'antracnose sur: **A** ; les feuilles, **B**; les tiges, **C**; les gousses et **D**; les graines.

[**D** (Champion, 1997) ; **A**, **B** et **C**(Sivachandrakumar, 2016)]

## II.6. Cycle de maladie :

### II.6.1. Infection primaire :

L'infection primaire et la progression de la maladie sont provoquées par l'inoculum primaire (Rapilly, 1968). Cette dernière peut avoir plusieurs origines, les graines contaminées, les débris de cultures fournissent une source d'inoculum (Yu, 1947). Les repousses peuvent aussi constituer une source plus importante d'inoculum (Bond et Pope, 1980). La transmission par les semences est la source d'inoculum la plus citée (Sprague, 1929 ; Yu, 1947 ; Michail *et al.* 1983). Selon Dekker (1957), au cours de la germination la majeure partie des infections précoces résulterait de la progression du mycélium depuis les téguments jusqu'à l'embryon. L'invasion de celui-ci s'accomplit entre le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> jour après l'imbibition de la graine



### II.6.2. Infection secondaire :

La gravité de l'infection secondaire dépend de l'abondance de l'inoculum primaire, de l'espacement entre les plantes et des conditions environnementales qui prévalent dans la région (**Sivachandrakumar, 2016**).

Une fois que les foyers primaires sont formés, des générations successives des pycnidiospores d'*A.pisi* se propage en présence de lumière et une température de 20 à 24°C (**Hare et Walker, 1944**) et provoque des dommages plus importants chez le pois (**Bretag, 1991**). Cet inoculum secondaire se propage habituellement par des gouttelettes d'eau (splashing) transféré par le vent, l'infection est également favorisée par l'abondance des précipitations ou par toute autre pratique culturale pratiquée pendant les périodes humides (**Punithalingham et al., 1972**). Ces cycles d'infection secondaires peuvent survenir plusieurs fois sur le terrain tout au long de la saison de croissance (**Roger et Tivoli, 1996**). L'alternance de temps humides et secs peut ralentir la maladie et il s'arrête complètement à une température supérieure à 35°C.

### II.7. Mécanisme d'infection :

*Ascochyta pisi* est un phytopathogène pénètre la plante de pois à travers la cuticule de feuillet. D'abord, les spores adhérentes à la surface des feuilles grâce à un mucilage. Après germination des spores, l'élongation du tube germinatif et la formation d'un appressorium ensuite une hyphe pénétrante issue de l'appressorium traverse la cuticule et franchit le passage entre les parois de deux cellules épidermiques suivi par une ramification des hyphes qui sont accolées à l'extérieur des cellules palissadiques puis envahissent l'espace intercellulaire. La ramification de thalle s'accompagne d'un collapsus des tissus superficiel et désorganisation des cellules palissadiques.

La colonisation de parenchyme lacuneux est principalement intracellulaire. Il perd sa cohésion en raison de modification au niveau des lamelles moyennes pectiques, le cytoplasme devient hétérogène et le plasmalemm se dégrade (**Heath et Wood, 1969**). L'action destructive du parasite s'exprime par l'apparition des lésions brun clair atteint au bout de 8<sup>ème</sup> jour un diamètre de 2 mm (extension maximale entre 0.25 et 0.48 mm/j).

- **Action des enzymes dans la dégradation des parois :**

En plus de la cutine, le xylane et la pectine sont également présents dans la paroi cellulaire de la plante hôte. L'enzyme de cutinase produit par l'agent pathogène *A.pisi* dégrade la cuticule de la plante en monomères de cutine, qui aident à l'attachement des spores à l'hôte. (**Nasraoui et al., 1990**).

Les endo hydrolases et transéliminases ou lyases sont attribués une action directe sur la fraction rhamnogalacturonique des parois et provoquent la perte de cohésion entre les cellules qui résultent de la dégradation de la lamelle moyenne et de son voisinage. (**Bateman et Basham, 1976**).

La genèse des lésions limitées causées par *A. pisi* exige la présence des activités pectinolytique et hémicellulolytique et la perte de cohésion des tissus provoquée par la transéliminase est indiscutable. (**Heath et Wood, 1971**).

### II.8. Mécanismes de défense de l'hôte :

Selon **Agrios (1997)**, les plantes supérieures y compris la plante de pois disposent un large éventail de mécanismes de défense contre l'attaque d'*Ascochyta pisi*.

Les réactions de la plante de pois à cet agent pathogène sont extrêmement complexes. Le stress biotique provoqué par l'agent pathogène *Ascochyta pisi* et abiotique (condition favorable à la croissance) peut provoquer des changements biologiques et physiologiques chez la plante par :

- Renforcement physique de la paroi cellulaire par lignification, submersion et dépôt de callose.
- La production de phytoalexines : la pisatine qui représente la principale phytoalexine du pois, elle fait partie au groupe des isoflavonoïdes (**Cruickshank et Perrin, 1960, 1961**). **Cruickshank (1962)** montre qu'*A. pisi* est plus tolérant à la pisatine qu'un ensemble des champignons non parasites du pois. L'accumulation de pisatine dans les tissus colonisés par *A. pisi* se poursuit de 1<sup>er</sup> à 14<sup>eme</sup> jour après le début de l'incubation.
- L'extension des macules provoquée par ce parasite serait limitée si l'endocarpe du pois infecté par *A.pisi* contenait plus de 1000 g / mL. *In vitro* cette concentration provoque une inhibition de 90% d'*A. pisi* (**Allard et al., 1993**).
- La réaction d'hypersensibilité c'est une nécrose rapide des cellules entourant le point d'infection, ce qui limite le développement du pathogène.

### III. Lutte biologique :

La progression de la maladie d'antracnose qui touche un large éventail d'hôtes provoque des dégâts importants pour l'homme et sur les espèces végétales. Pour remédier à ces problèmes plusieurs stratégies sont utilisées pour lutter contre l'agent pathogène *A. pisi* de petit pois, des méthodes culturelles, chimiques et biologiques.

Les fongicides chimiques sont les plus couramment utilisés. Toutefois, cette stratégie rencontre rapidement ses limites en raison de nombreux désavantages liés aux phénomènes de pollution

résiduelle, à la phytotoxicité, au déséquilibre biologique et surtout au risque de sélection des souches résistantes aux fongicides (Arias-Rivas *et al.*, 1998 ; Dorrance *et al.*, 2004). Face à ces problèmes les chercheurs ont proposé nombreuses alternatives de lutte biologique par l'exploration des ressources naturelles notamment les plantes médicinales, apparaît comme une piste prometteuse de remédiation biologique (Scherrer *et al.*, 2005). Actuellement, les chercheurs ont considéré les huiles essentielles extraites à partir des plantes aromatiques comme une alternative aux pesticides synthétiques pour lutter contre le pathogène, en raison de leurs activités antifongiques, non-phytotoxicité et biodégradabilité (Essawi et Srurr, 2000 ; Znini *et al.*, 2013).

### III.1. Généralité sur les huiles essentielles :

Les huiles essentielles ou les huiles étherées sont des substances naturelles volatiles, d'odeur tout à fait caractéristique que l'on extrait de certains végétaux aromatiques botaniquement définie. Leur extraction se fait par plusieurs méthodes, soit par distillation sèche, entraînement à la vapeur d'eau, par pression, par incision de la plante, ou bien parfois par séparation à l'aide de solvants soit encore par adsorption sur des graisses (enfleurage) (Marouf et Gérard, 2015).

Elles peuvent être extraites de différentes parties des plantes comme les feuilles, les fleurs, les fruits, les tiges, les graines et les racines. Les HEs existent quasiment chez certaines familles des angiospermes telles que les *Rutaceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Asteraceae* et *Zingiberaceae* (Regnault-Roger *et al.*, 2012).

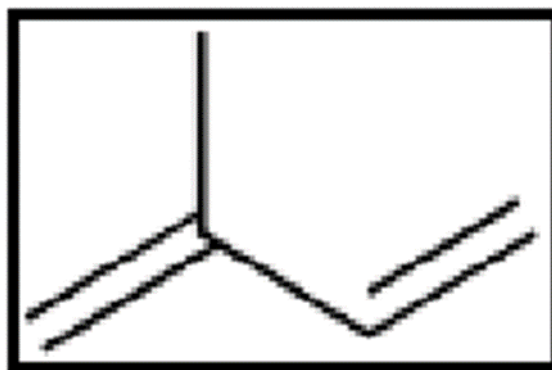
Les essences sont des métabolites secondaires constituent un moyen de défense contre les ennemies naturelles et l'attraction des insectes pollinisateurs vers leurs hôtes (Harrewijn *et al.*, 2001). Elles possèdent aussi des propriétés antimicrobiennes et antifongiques (Znini, 2011). Le pouvoir antifongique de ces sécrétions végétales a fait l'objet de nombreuses études *in vitro*. (Arraiza *et al.*, 2018) ont montré que cette activité des HEs dues à l'inhibition de : la germination des spores, de formation du corps fructifère et par conséquent l'inhibition de croissance mycélienne.

### III.2. Composition des huiles essentielles :

Chaque huile essentielle est bien spécifique et complexe et très variable selon plusieurs paramètres, tels que les biotopes, l'espèce, la partie de plante, la provenance et le fabriquant. Les HEs sont des produits naturels peuvent contenir plus de 300 composés différents généralement de faible poids moléculaire inférieur à 300 (Sell, 2006). Ces composées classées en deux grandes groupes : les terpènes (isoprène) et terpénoïdes (isoprénoïdes). Qui sont en générale très nettement dominants et le groupe des composés aromatiques.

- **Terpènes et Terpénoïdes :**

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels existents en deux structures cycliques ou chaîne ouverte. Ils sont constitués principalement d'unités isopréniques à cinq atomes de carbone (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) (Hernandez-Ochoa, 2005 ; Fillatre, 2011) **Figure 7**.



**Figure 7:** Formule de l'isoprène (Fillatre, 2011)

Les terpènes sont classés selon le nombre d'unités isopréniques, on définit alors hémiterpènes (1 unité : C<sub>5</sub>), monoterpènes (2 unités : C<sub>10</sub>), sesquiterpènes (3 unités : C<sub>15</sub>), diterpènes (4 unités : C<sub>20</sub>), sesterpènes (5 unités : C<sub>25</sub>), triterpènes (6 unités : C<sub>30</sub>) etc. les monoterpènes sont des composés à faible poids moléculaire, s'évaporent rapidement et représentent environ 90% de compositions des HEs (Buckle, 1997 ; Nazzaro *et al.*, 2017). Ils comprennent plusieurs groupements fonctionnels organiques, y compris les hydrocarbures tels que l' $\alpha$ -Pinène ,  $\beta$ -Pinène , le p-cimène et le myrcène, des cétones telles que la carvone et la pulegone; des esters tels que l'acétate de linalyle et le menthyle, des alcools tels que le linalool, des aldéhydes tels que le citronellal et le géraniol; des éthers tels que le 1,8-cinéole et le menthofurane; des peroxydes tels que l'ascaridole; des phénols tels que le thymol et le carvacrol (Eslahi *et al.*, 2018) . Les terpénoïdes (isoprénoïdes) sont des terpènes oxygénée (Bakkali *et al.*, 2008).

- **Composés aromatiques :**

Les composés aromatiques des huiles essentielles sont des dérivés du phénylpropane C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, ils sont moins fréquents que les terpènes et leurs dérivés. On peut rencontrer dans ce groupe des aldéhydes (cinnamaldéhyde), des alcools (alcool cinnamique), des phénols (chavicol, eugénol), des dérivés méthoxy (anéthol, estragol) ou méthylène dioxy (myristicine, safrol) (Bruneton, 1999). Cependant, ils peuvent aussi contenir des composés C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, comme la vanilline et l'antranilate de méthyle. Par ailleurs, les lactones dérivées des acides cinnamiques

(des coumarines) peuvent être entraînées par la vapeur d'eau lors de l'extraction des huiles essentielles (Bruneton, 2009).

### III.3.Mode d'action des huiles essentielles :

En général, les huiles essentielles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium et la toxinogénèse chez les moisissures et agissent sur la biomasse et la production du pseudomycélium chez les levures (Hulin *et al.*, 1998). Des recherches publiées ont révélé que leur mécanisme d'action implique une pénétration à travers les parois cellulaires et des dommages directs sur les membranes plasmiques et mitochondriale (Bakkali *et al.*, 2008).

#### • Perturbation, altération et inhibition de la paroi et la membrane cellulaire :

La paroi cellulaire fongique joue un rôle très important dans le maintien de l'intégrité structurale des cellules fongiques, la croissance et la survie de champignon. Les trois majeurs éléments structuraux, glucane, chitine et mannane sont généralement considérés comme des cibles thérapeutiques des HEs. Alors, une fois la structure de l'un de ces derniers est endommagée la morphologie des cellules ne peut plus être maintenue et les cellules deviennent osmotiquement fragiles (Moore *et al.*, 1992). L'inhibition de polymérisation de la chitine peut affecter la maturation des parois, la formation des septums et la formation des bourgeons, en endommageant la division cellulaire et la croissance cellulaire (Wu *et al.*, 2008).

L'anéthol, un composant majeur de l'HE d'anis affecte la rigidité de la paroi cellulaire et provoque des changements morphologiques des hyphes (hyphes enflées à leur extrémité) de *Mucor mucedo*.

L'HE de *Litsea crubeba* riche en composant citral, capable de présenter une activité antifongique contre *Alternaria alternata*, *A. Niger*, *Fusarium moniliforme* et *F. Solani*, par des dommages de leur paroi cellulaire et leur membrane cellulaire à des divers degrés, fuite de cytoplasme et inhibition partielle de la biosynthèse de l'ADN, de l'ARN (kerekés *et al.*, 2013).

L'HE de *coriandum sativum* (coriandre), agit sur la perméabilité membranaire des *candida* ssp par la réduction de la biosynthèse de l'ergostérol (composé de la membrane cellulaire similaire au cholestérol, assure le maintien de l'intégrité cellulaire). La suppression ou la réduction d'ergostérol dans les membranes fongiques entraîne une déstabilisation des métaboliques et des effets osmotiques des cellules fongiques (Fereires *et al.*, 2014).

#### • Dysfonctionnement mitochondriale :

Certaines huiles essentielles peuvent avoir un effet sur l'efficacité mitochondriale par l'inhibition de l'action des déshydrogénases mitochondriales. Nécessaires à la biosynthèse de l'ATP, comme la déshydrogénase du lactate, du malate et du succinate. (Chen *et al.*, 2013) ont

démontré la capacité d'HE d'*Anethum graveolens* à agir comme agent antifongique. Également par la perturbation du cycle de l'acide citrique et l'inhibition de la synthèse de l'ATP dans les mitochondries *C.albicans*. Par ailleurs, les HEs d'*Origanum compactum*, d'*Artemisia herba alba* et de *Cinnamomum camphora* ont montré une augmentation du nombre de petites mutations cytoplasmiques, ce qui signifie lésions mitochondriales chez *Saccharomyces cerevisiae* (Bakkali et al., 2006). Haque et al., (2016) ont suggéré que les terpénoïdes pourraient jouer un rôle essentiel dans la réduction du contenant mitochondrial, ceci conduit à une modification du niveau d'oxygène réactif (ROS) et de la génération d'ATP.

- **Inhibition enzymatique :**

De nombreux champignons produisent des enzymes endocellulaires et plus particulièrement extracellulaires telles que les amylases et les protéases, ces derniers permettant au champignon la décomposition des polysaccharides et des protéines de l'hôte en sucres et acides aminés facilement assimilable. Cependant, plusieurs études ont confirmé l'inhibition de l'activité enzymatique des champignons par les huiles essentielles mais les mécanismes sont encore limités. Savkovic et al., (2016) ont affirmé que l'existence d'un noyau aromatique avec groupe hydroxyle (OH-) est responsable de réaliser des liaisons d'hydrogène avec les sites actifs des enzymes microbiennes cibles.

Les huiles essentielles de myrte (*Myrtus communis*), de genévrier (*Juniperus communis*), de mélisse (*Melissa officinalis*) et l'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*) ont une activité de réduction remarquable des enzymes de xynalase et carboxyméthylcellulase produites par les champignons de rumen *Neocallimastix sp* et *Orpinomyces sp* à partir à une concentration de 0,5 mg/mL d'huile essentielle (Ekinici et al., 2017).

L'huile essentielle d'*Eucalyptus rostrata* entraîne une diminution de production des enzymes cellulases et chitinases de deux champignons pathogènes *Trichoderma virens* et *Fusarium solani* (Hamedo et El shamy, 2008).

### III.4.Méthodes d'extraction :

L'extraction des huiles éthérées se fait par différentes méthodes. Généralement, les méthodes d'extraction dépendent de la partie végétale à traiter (plante entière, pétales, feuilles, fruit, fleur ou racines), la nature des composés recherchés, le rendement en huile et la fragilité des certains composants (Bruneton, 1999). Parmi les méthodes d'extraction :

#### III.4.1. Extraction par expression à froid :

L'un des procédés les plus simples mais, elle ne s'applique qu'aux agrumes qui ne supportent pas les préparations chaudes, cette méthode consiste soit à presser les péricarpes sous courant

d'eau, soit à presser l'ensemble des agrumes entre des cylindres mécaniques, puis à séparer l'huile de l'eau à l'aide d'un décanteur ou d'une centrifugeuse. (Khalfi-habes, 2007).

### III.4.2. Hydro-diffusion :

Méthode relativement récente, consiste à déplacer la vapeur d'eau du haut vers le bas à basse pression (0.02-0.15 bar) à travers le matériel végétal.

L'idée de base derrière cette méthode, selon **Franchomme et Penoel (1990)**, est d'utiliser la gravité pour libérer et condenser un mélange « vapeur d'eau- huile essentielle » qui a été dispersé dans la matière végétale.

#### 1. Enfleurage :

Ce procédé classique, ancien et peu utilisé de nos jours. Ce dernier est employé principalement pour les fleurs fragiles en parfumerie. Il s'agit de disperser des composés odorants dans une masse de matière grasse animale, lorsque le procédé est réalisé à froid, il s'agit d'une extraction par enfleurage, lorsqu'il est réalisé à haute température, les graisses étant chauffés dans un bain- marie entre 50°C et 70°C, il s'agit d'une digestion (**Besombes, 2008**).

#### 2. Extraction par des solvants : basée sur trois étapes

- 1<sup>re</sup> étape : aboutit à un mélange de cire appelé concrète (huile essentielle 50% et Cire 50%).
- 2<sup>ème</sup> étape : un solvant, généralement l'éthanol est utilisé dans le but de dissoudre la cire.

Ce processus est répété plusieurs fois.

- 3<sup>ème</sup> étape : le mélange, alcool/ cire est vaporisé sous vide.

L'avantage de cette méthode est la possibilité d'obtenir un produit constant. Mais son principal inconvénient est l'incapacité d'éliminer les résidus de solvant.

#### 3. Entraînement à la vapeur d'eau :

Dans ce type d'extraction, le matériel végétal n'est pas directement immergé dans l'eau ; au lieu de cela, il est placé sur la grille avec des trous qui laissent passer la vapeur d'eau. Cela perturbe la structure des cellules végétales, libérant des molécules volatiles qui sont attirées vers le réfrigérant. Ce procédé améliore la qualité de l'huile essentielle en réduisant l'altération hydrolytique (**Franchomme et al., 1990 ; Richard, 1992 ; Lucchesi, 2005**).

### III.4.3. Hydrodistillation :

Selon **Belghit (2016)** l'hydrodistillation est la méthode la plus simple et ancienne utilisée. La matière végétale est complètement immergée dans un alambic rempli d'eau, puis tout est porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensés dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par une simple différence de densité.

#### **IV. Présentation de la plante étudiée :**

Le genre *Juniperus* appartenant à la famille des Cupressaceae, comprend environ 75 espèces (Adams, 2014), répartis en Afrique du Nord, en Afrique du sud, au sud de l'Europe, en Asie, en Arabie Saoudite, en Jordanie et dans les Iles Canaries (Adams, 1998 ; Maatooq et al., 1998). En Algérie, cinq espèces indigènes sont énumérées, à savoir, *J. communis*, *J. phoenicea*, *J. oxycedrus*, *J. sabina* et *J. thurifera* (Quezel et Santa, 1963). *J. phoenicea* connus en Algérie sous le nom vernaculaire d'Arâar.

##### **IV.1. Position taxonomique :**

Deux variétés sont connues pour cette espèce : *J. phoenicea var. phoenicea* (des cônes sont globuleux) et *J. phoenicea var. turbinata* (des cônes sont turbines) (Achak, 2006).

- La classification du genévrier de Phénicie selon Teibi, (1992) et Adams, (2004) :

**Règne :** Plantae

**Division :** Pinophyta

**Classe :** Pinopsida

**Ordre :** Pinales

**Famille :** Cupressaceae

**Genre :** *Juniperus*

**Espèce :** *Juniperus phoenicea*.

##### **IV.2. Description botanique :**

Le genévrier rouge ou *Juniperus phoenicea* est un arbuste dressé de 1 à 8 mètre (Benabid, 2000 ; Huguet, 2008 ; Rameau, 2008). Il est de forme pyramidale. Les feuilles se présentent souvent toutes en forme de petites écailles ovales rhomboïdales, obtuses, convexes, sillonnées sur le dos, glanduleuses et de couleur vert foncé (Varlet, 1992 ; Jaume Saint-Hilaire, 2010 ; Chazel et Chazel, 2012). L'écorce est de couleur brun rougeâtre à grisâtre, épaisse et gerçure (Bonnier, 1931). L'appareil reproducteur mâle et femelle généralement sont souvent réunis sur les mêmes pieds, les premières forment de très nombreux petits chatons ovales ou arrondis au niveau de la partie terminale des ramilles, dont les écailles portent les sacs polliniques (cônes males), les fleurs femelles sont beaucoup moins nombreuses, leurs écailles sont épaisses, aigues et disposées sur 4 rangs (Brochant de Villers et al., 2008). La floraison s'étend de février à avril et finit par produire de fausses baies sphériques rouge sombre à maturité (Chazel et Chazel, 2012). Le fruit se forme de baies de couleur verte au début virant au brun rouge dans le stade de maturité, de forme globuleuse et charnue, d'un diamètre de 7 à 10 mm, à surface

irrégulière (Brochant de Villers *et al.*, 2008 ; Huguette, 2008 ; Varlet, 2008). La période de fructaison a lieu de septembre à décembre (Zereg, 2011) Figure 8.



Figure 8: les différentes parties de la plante de *Juniperus phoenicea* (Bouyahyaoui, 2017)

### IV.3. Propriétés thérapeutiques :

Le mélange des feuilles et des cônes femelles est largement utilisé en médecine traditionnelle algérienne et marocaine pour traiter le diabète (Bellakhdar, 1997 ; Bouzabata, 2013 ; Telli *et al.*, 2016). Les cônes femelles sont utilisés contre l'ulcère du pied (Telli *et al.*, 2016), le système aérien de la plante est largement utilisé dans le traitement des troubles digestifs et les complications gastro-intestinales (Boudjelal *et al.*, 2013 ; Chermat et Gharzouli, 2015). La plante est également utilisée pour ses propriétés anti-hypertensives, anti-inflammatoires, antiparasitaires et antiseptiques (Boudjelal *et al.*, 2013). Elle intervient aussi dans les soins des plaies et des eczémas (Boudjelal *et al.*, 2013 ; Miara *et al.*, 2019).

### IV.4. Composition chimique d'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* :

D'après l'analyse chimique d'un HE extraite à partir des feuilles séchées récoltées dans la région de Ain sefra wilaya de Naama à djebel Morghad, réalisé par Bouyahyaoui (2017), en utilisant la technique de chromatographie en phase gazeuse - détecteur à ionisation de flamme

(CPG-DIF) couplée à la spectrométrie de masse (SM) les composants majoritaires obtenus pour cette essence sont résumés dans le **Tableau 3**:

**Tableau 3: les composants majeurs d'huile essentiel de *Juniperus phænicea***

Composants	Pourcentage %
<b><math>\alpha</math>-Pinène</b>	55,9
<b><math>\delta</math>-3-carène</b>	2,3
<b>1-epi-Cubénol</b>	1,9
<b>Myrcène</b>	1,8
<b>Germacrène D ; Abiétal</b>	1,7
<b><math>\gamma</math>-Amorphène , <math>\delta</math>- Cadinène , <math>\beta</math>-Caryophyllène</b>	1,6

## **I. Matériel fongique :**

### **I.1. Échantillonnage :**

L'échantillon concerné dans notre étude est constitué d'isolats prélevés à partir du fruit de la plante de pois (*Pisium sativum* L.) présentant des nécroses. Ces fruits ont été collectés pendant le mois de février de différentes wilayas d'Algérie à partir du marché de Tlemcen et Naama, d'où l'origine culturelle de ces fruits est : Tlemcen (Remchi), Mascara, Mostaganem et Oued souf (**Figure 9**).



**Figure 9: Échantillons de gousses de petit pois présentant les symptômes d'anthracnose**

### **I.2. Isolement et purification des champignons :**

#### **I.2.1. Méthode d'isolement :**

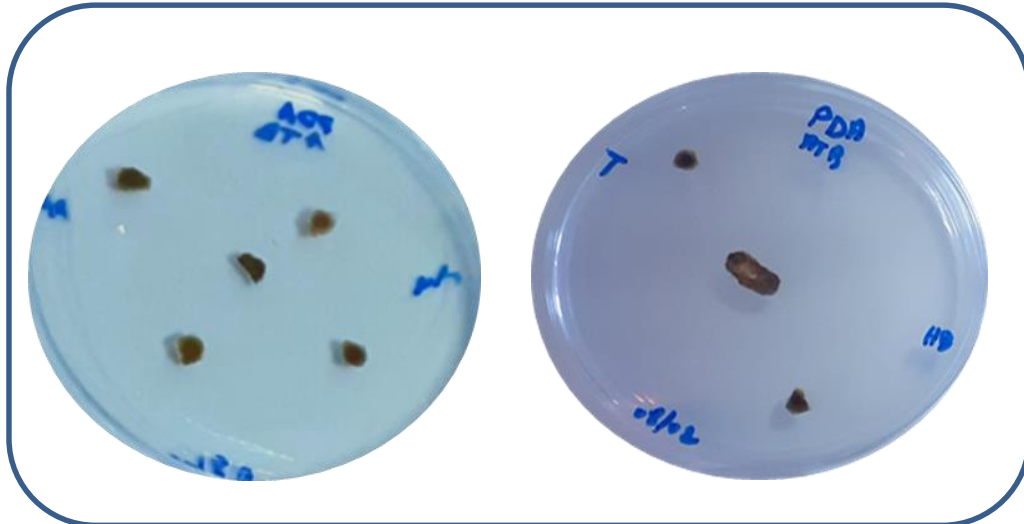
- **L'isolement du pathogène par la méthode de RAPPILY 1968.**

Chaque échantillon est mis dans un sac en papier étiqueté, et amené au laboratoire pour l'isolement du pathogène. Les fruits sont d'abord rincés avec l'eau de robinet puis on procède à l'isolement de l'agent pathogène par la méthode décrite par **Rappily (1968)**. Cette dernière consiste à prélever des fragments de 5 mm à partir du matériel végétal frais présentant des taches nécrotiques. Ces fragments sont désinfectés avec une solution de l'hypochlorite de sodium à 2° pendant cinq (05) minutes (afin d'éliminer la flore saprophyte), suivis de trois (03) bains successifs à l'eau distillée stérile. Une fois sécher sur papiers buvard stérile, deux (02) à

cinq(05) fragments sont déposées dans des boites de pétri contenant le milieu de culture PDA solide (**Annexe 1**) + ATB ( pour minimiser la contamination) (**Figure 10**).

– **Conditions d’incubation :**

L'ensemble des boites sont mis à incuber á 22°C pendant sept (07) jours sous une photopériode de 12 heures.



**Figure 10: Isolement du champignon à partir des gosses.**

### I.2.2. Méthode de Purification :

Après incubation, les boites pétri contenant les six (06) isolats non contaminés sont sélectionnés.

- Afin d’effectuer des repiquages successifs de manière aseptique des explants de culture (1 cm \* 1 cm) sont prélevées au niveau de la zone périphérique des colonies, puis les déposer dans des nouvelles boîtes contenant le même milieu, l’opération est renouvelée jusqu’à obtention d’une culture pure.
- Dès l’apparition des filaments mycéliens autour des fragments, des observations microscopiques sont réalisées, les isolats présentant les caractères d’*Ascochyta pisi* sont cultivés sur milieu mathur (**Annexe 1**) afin de favoriser la pycniogenèse (**Champion, 1997**). Pour limiter les risques de variabilité des isolats, nous avons réalisé des cultures monospores.

❖ **Culture monospores :**

- L’objectif principal de cette technique est d’obtenir un matériel fongique génétiquement homogène. Pour cela, on prépare une suspension des spores, en prélevant un explant à partir de la marge d’une culture âgée de 7 à 10 jours cultivés sur milieu PDA, puis l’introduire dans un tube contenant 9 mL d’eau distillée stérile et on agite à l’aide d’un vortex.

- Ensuite, à partir de cette solution concentrée on effectue des dilutions au dixième :  
On prélève 1 mL de la suspension sporale que l'on introduit dans un tube contenant 9ml d'eau distillée stérile puis on agite. On répète l'opération jusqu'à la dilution  $10^{-4}$ .
- A partir de dilutions ( $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ ), on prélève 1mL que l'on étale sur le milieu Agar 2% (**Annexe 1**).
- Après incubation de 48 heures à 22°C et à l'aide d'une loupe binoculaire les spores germées sont repérées puis délimitées d'un cercle d'environ 2 mm et à l'aide d'une aiguille stérile faire un ensemencement de manière aseptique sur milieu PDA (**Zerrouk, 1994**)

## **II. Identification des isolats :**

- Après avoir obtenu des souches pures, des examens macroscopiques et microscopiques sont effectués.

### **II.1. Etude macroscopique :**

- L'examen de l'aspect morphologique des 06 isolats se fait à l'œil nu, à partir des colonies incubées à 22°C pendant dix (10) jours sur milieu PDA.
- Ce type de caractérisation est basé essentiellement sur les critères suivants :  
La couleur des colonies (recto, verso), l'aspect du mycélium et la vitesse de croissance

### **II.2. Etude microscopique :**

Afin de favoriser la sporulation et voir la structure intacte de champignon, on passe par la culture sur milieu CLA (Carnation-Leaf-piece Agar) qui est un milieu à base naturelle contenant des morceaux de la feuille d'œillet.

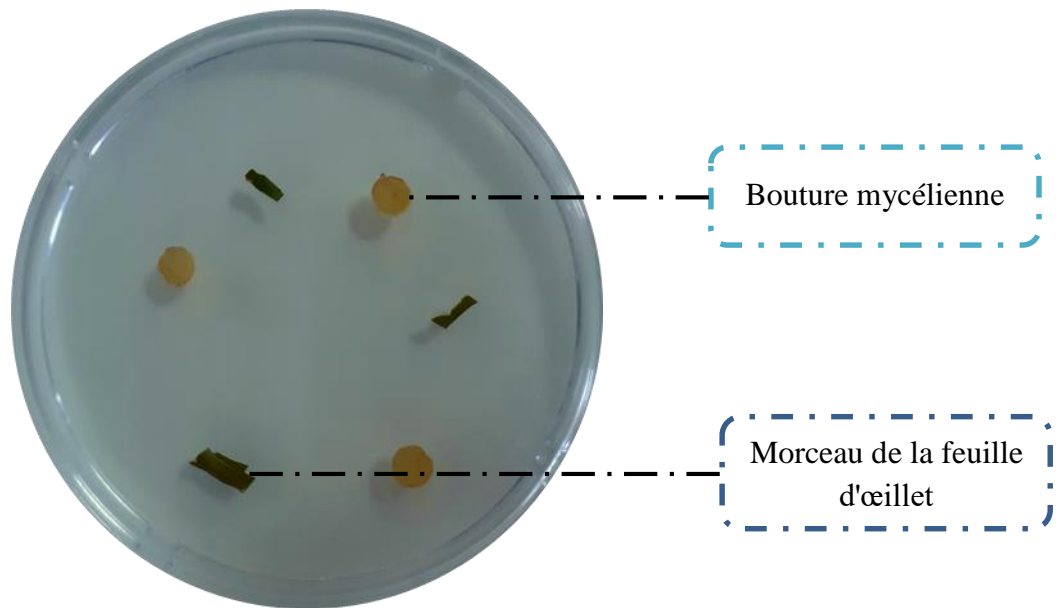
#### **❖ Préparation des feuilles d'œillet :**

Les feuilles d'œillets fraîches sont découpées en petits morceaux de 5-8 mm<sup>2</sup>, puis mises à sécher dans un four (~70°C) pendant 3 à 4 heures. Après stérilisation, ils sont prêts à utiliser. Le stockage de ces petits morceaux se fait dans un endroit sec de température ambiante jusqu'à 12 mois avant usage (**Leslie et Summerell, 2006**).

Dans une boîte de pétri contenant le milieu gélose 2% (**Annexe 1**) on dépose une bouture mycélienne à côté de cette feuille d'œillet stérile. **Figure 11**

Après 7 jours d'incubation on effectue une observation microscopique nette de mycélium cloisonné, les pycnides et les pycnidiospores, à partir d'un fragment mycélien.

La caractérisation macroscopique et microscopique est basée sur les clés d'identification de **Champion, 1997 ; Mel'nik, 2000 ; ISTA, 2008**.



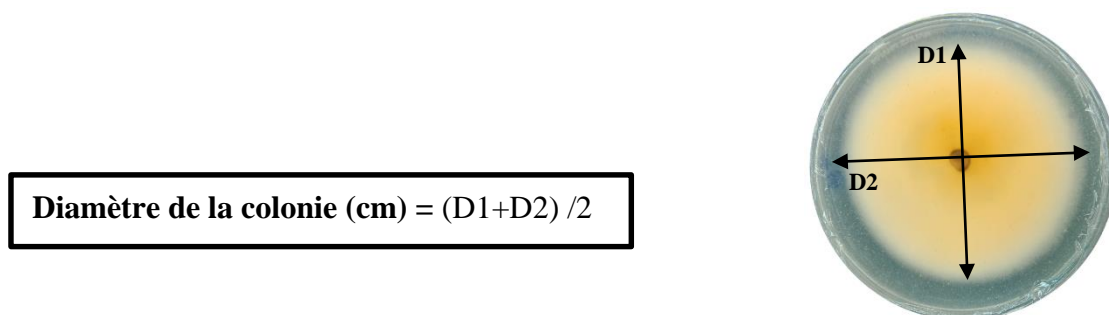
**Figure 11: Méthode d'identification CLA.**

### **III. Conservation des isolats :**

Les cultures pures sont repiquées dans des tubes à essai inclinés contenant le milieu PDA, puis incubées à 22°C pendant 7 jours. La conservation est effectuée à 4°C pour des utilisations ultérieures (Rapilly, 1968).

### **IV. Mesure de la croissance mycélienne :**

D'après Rapilly (1968) l'estimation de la croissance mycélienne consiste à mesurer la croissance linéaire et diamétrale des colonies du pathogène **Figure 12.**



$$\text{Diamètre de la colonie (cm)} = (D1+D2) / 2$$

**Figure 12: Mesure de diamètre de colonie**

## V. Etude de l'activité amylolytique :

### V.1. Les amylases :

Les amylases sont des enzymes hydrolytiques utilisées depuis de nombreuses décennies (Gupta *et al.*, 2008 ; Sundarram et Murthy, 2014). Ils catalysent spécifiquement l'hydrolyse de l'amidon.

L'amidon est une substance majeure de réserve et entrant dans la structure cellulaire des végétaux. Elle se produit principalement dans les racines, les graines et les tubercules de plantes supérieures et localisés dans les chloroplastes au niveau du stroma. La structure chimique d'amidon consiste à un polymère hétérogène contiennent deux types de molécules formées de résidus de D-anhydro glucopyranoses :

L'amylose qui est un polymère linéaire caractérisé par des enchainements  $\alpha$ -1,4 glucosidique liés entre les résidus (Monties, 1980).

L'amylopectine se caractérisant par une structure branchée correspondant à 5% de résidus liés en  $\alpha$ -1,6 glucosidique (Sine, 2010).

– L'amylose et l'amylopectine présentent dans l'amidon avec des proportions variables selon les espèces et les variétés.

#### 1.1 Classification des amylases :

On distingue trois types d'enzymes amylolytiques de genre glycoside hydrolases (Sundarram et Murthy, 2014), caractérisées par leur mode de dégradation du substrat ainsi que par la nature du produit formé :

- **Les enzymes spécifiques des liaisons  $\alpha$ -(1, 4) :**

–  **$\alpha$ -amylases (EC 3.2.1.1) ou endo-amylases:**

L' $\alpha$ -amylase ou  $\alpha$ -(1,4) D-glucane glucanohydrolase est une endo-glycanase appartenant à la classe des hydrolases, capable de franchir la liaison  $\alpha$ -(1,6) glucosidique de l'amylopectine, sans pourtant l'hydrolyser. Leur action s'effectue au niveau des liaisons  $\alpha$ -(1,4) glucosidique présenté dans la partie interne (endo) de l'amylose ou l'amylopectine et libère du D-glucose, D-maltose et une petite quantité de dextrine (Zoubiri, 2011).

–  **$\beta$ - amylases ou  $\alpha$ -1,4-glucane maltohydrolase (EC: 3.2.1.2) ou exo-amylases:**

Elles attaquent les chaînes d'amylose et d'amylopectine à partir de l'extrémité non réductrice pour produire du  $\beta$ -maltose de manière récurrent, il est impossible de franchir les liaisons ramifiées dans l'amylopectine, l'hydrolyse s'arrête à deux ou trois résidus de glucose avant celles-ci. Cette action est donc incomplète, ce qui conduit à la production de 50 à 60% de maltose et le reste est formé de dextrine (Vallier *et al.*, 1977 ; Sundarram et Murthy, 2014).

### ❖ Les enzymes spécifiques des liaisons $\alpha$ -(1,6)

#### – L'iso amylase (EC 3.2.1.68) :

L'iso amylase est dite enzyme débranchant par ce qu'elle hydrolyse les liaisons  $\alpha$ -(1,6) de l'amylopectine et libère des fragments d'amylose ou des oligomères de glucose qui sont ensuite attaqués par les  $\alpha$ -amylases et les  $\beta$ -amylases.

### ❖ Les enzymes spécifiques des liaisons $\alpha$ -(1,4) et $\alpha$ -(1,6) :

#### – L'amyloglucosidase ou glucoamylase (EC : 3.2.1.3) :

La  $\gamma$ -amylase ou l'acide maltase, clive les liaisons glucosidiques  $\alpha$ -(1,6), et les dernières liaisons glucosidiques  $\alpha$ -(1,4) à l'extrémité non réductrice de l'amylose et de l'amylopectine. Elle est capable d'hydrolyser complètement l'amidon (Sundarram et Murthy, 2014).

## V.2. Recherche des activités amylolytique sur milieux solides :

Un milieu synthétique Czapeck + amidon 1%, Czapeck+ amidon 2% « avec amidon comme seul source de Carbone » et Czapeck + glucose 2 % « ou absence d'amidon » comme témoin (Annexe 1). Ils sont répartis dans des boîtes de pétri. A partir des cultures jeunes de 10 jours des six (06) isolats, des disques de biomasse fongique sont prélevés soigneusement à l'aide d'une pipette pasteur stérile puis déposés dans les boîtes (la partie mycélienne en contact avec la gélose). L'incubation a lieu dans une étuve réglée à 22°C pendant 10 jours. Afin d'évaluer la croissance mycélienne ont été réalisées deux répétitions pour chaque isolat. La mesure des deux diamètres perpendiculaires des colonies fongiques est effectuée toutes les 24 heures pendant 10 jours (Kaboré, 2001).

### ➤ Mise en évidence :

La mise en évidence de l'activité amylolytique se fait par traitement de la surface du milieu solide, par une solution de Lugol diluée et l'apparition de zone claire correspondant à l'hydrolyse de l'amidon par les amylases.

### ➤ Principe :

La coloration du milieu en bleu violacé dû à la formation d'un complexe entre l'iode et l'amidon (Solis-pereira *et al.*, 1993 ; Sudo *et al.*, 1994). De ce fait, l'activité amylolytique est révélée par l'apparition des halos clairs autour de la biomasse fongique

## V.3. Effet de variation de pH sur la croissance mycélienne :

Après la sélection de milieu de culture on passe à la détermination de pH optimal pour une bonne croissance mycélienne et production amyliasique.

A partir des cultures jeunes de 10 jours des différentes souches révélant une activité amylolytique, un disque mycélien de 6 mm est déposé dans des boîtes de pétri contenant le milieu Cz+ amidon 2% aux différents pH (4, 6, 8). L'incubation se fait à 22°C.

L'évaluation de l'évolution de la croissance mycélienne est effectuée chaque 24H par la mesure des deux diamètres perpendiculaires des colonies mycéliennes du champignon. La détermination de pH optimal de l'activité amylolytique est effectuée après 10 jours d'incubation par l'addition de lugol sur la surface des boîtes et la mesure des zones de lyse d'amidon.

#### **V.4. Optimisation de la croissance et de l'activité amylolytique sur milieu liquide :**

L'étude de l'évolution de la croissance mycélienne sur milieu solide, nous a permis de choisir la concentration d'amidon et de pH pour la quelle nos isolats ont eu une bonne croissance.

Les six (06) isolats ont été cultivées dans des erlenmeyers contenant 50 mL de milieu amidon liquide à 2% à pH= 6. Chacun de ces erlenmeyers a été inoculé par 03 disques de champignons, puis incubés pendant 10 jours à 22°C.

La biomasse de nos souches a été déterminée après 10 jours d'incubation, suite à une filtration avec une double mousseline stérile. Le mycélium est récupéré puis séché et pesé.

Notre étude de l'activité amylolytique a été accompagnée par la mesure de diamètre de la zone de lyse par la méthode cup- plate.

#### **V.5. Mise en évidence de l'activité amylolytique par la méthode cup-plate :**

Dans des boîtes de Pétri contenant 20 ml de milieu Cz + amidon 2%, à l'aide d'une pipette pasteur stérile on réalise 04 puits de 0,6 cm de diamètre. Dans lesquelles on ajoute 80µl de filtrat de culture. Pour l'essai témoin le filtrat traité par la chaleur (100°C pendant 15 min) avant d'être utilisé. Puis incubé l'ensemble des boîtes à 30°C pendant 24 heures.

La surface de la gélose de chaque boîte est ensuite recouverte avec 2 mL de révélateur (lugol) à l'aide d'un étaloir en verre.

L'étendue de l'hydrolyse autour de chaque puits est mesurée et l'activité enzymatique est calculée de la manière suivante :

$$D = d - 0.6$$

- **D** : activité enzymatique.
- **d** : diamètre de la zone d'hydrolyse.
- **0.6** : diamètre du puits (cm).

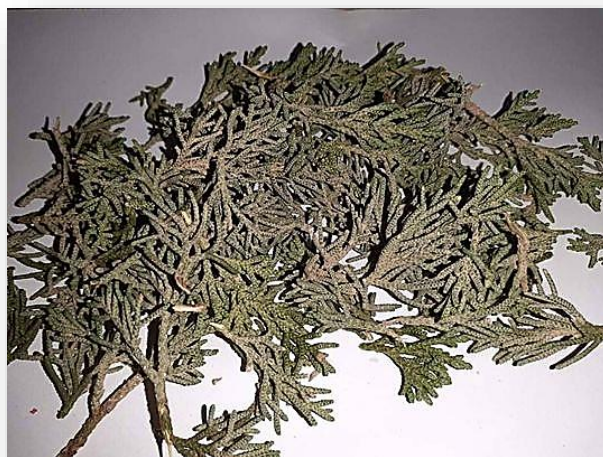
## **VI. L'essai *in vitro* de la lutte biologique :**

Les huiles essentielles de certaines plantes médicinales ont une activité antifongique importante et peuvent être utilisées comme alternatives aux fongicides, ce qui nous a conduit à choisir cette approche comme moyen de lutte contre le pathogène *Ascochyta pisi*.

### **VI.1. La collecte de la plante médicinale :**

- **Matériel végétal :**

L'espèce *Juniperus phoenicea* a été récoltée dans la wilaya de Naama, la région d'Ain sefra (Djbel Aissa) en février 2022. Les feuilles de la plante récoltée sont séchées à l'abri du soleil pendant huit (08) jours en moyenne (**Figure 14**).



**Figure 14:** feuilles de *Juniperus phoenicea*.

### **VI.2. L'extraction des huiles essentielles :**

L'extraction de l'huile essentielle des feuilles de *Juniperus phoenicea* séchées a été effectuée par la méthode d'hydrodistillation (water distillation) dans un montage du type Clevenger (**Figure 15**). Cette méthode consiste à introduire 150 g des feuilles séchées dans un

ballon de 01 litre rempli d'un volume suffisant d'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition pendant 2 à 3 heures à l'aide d'un chauffe ballon, les vapeurs chargées d'huile essentielle traversent le refroidisseur et se condensent ainsi avant de chuter dans une ampoule de décantation, l'huile se sépare par la suite de l'eau par différence de densité (Abdelli, 2017). L'huile essentielle obtenue est récupérée et conservée dans un tube ombré et bien scellé à une température de 4°C (Msaada *et al.*, 2012).

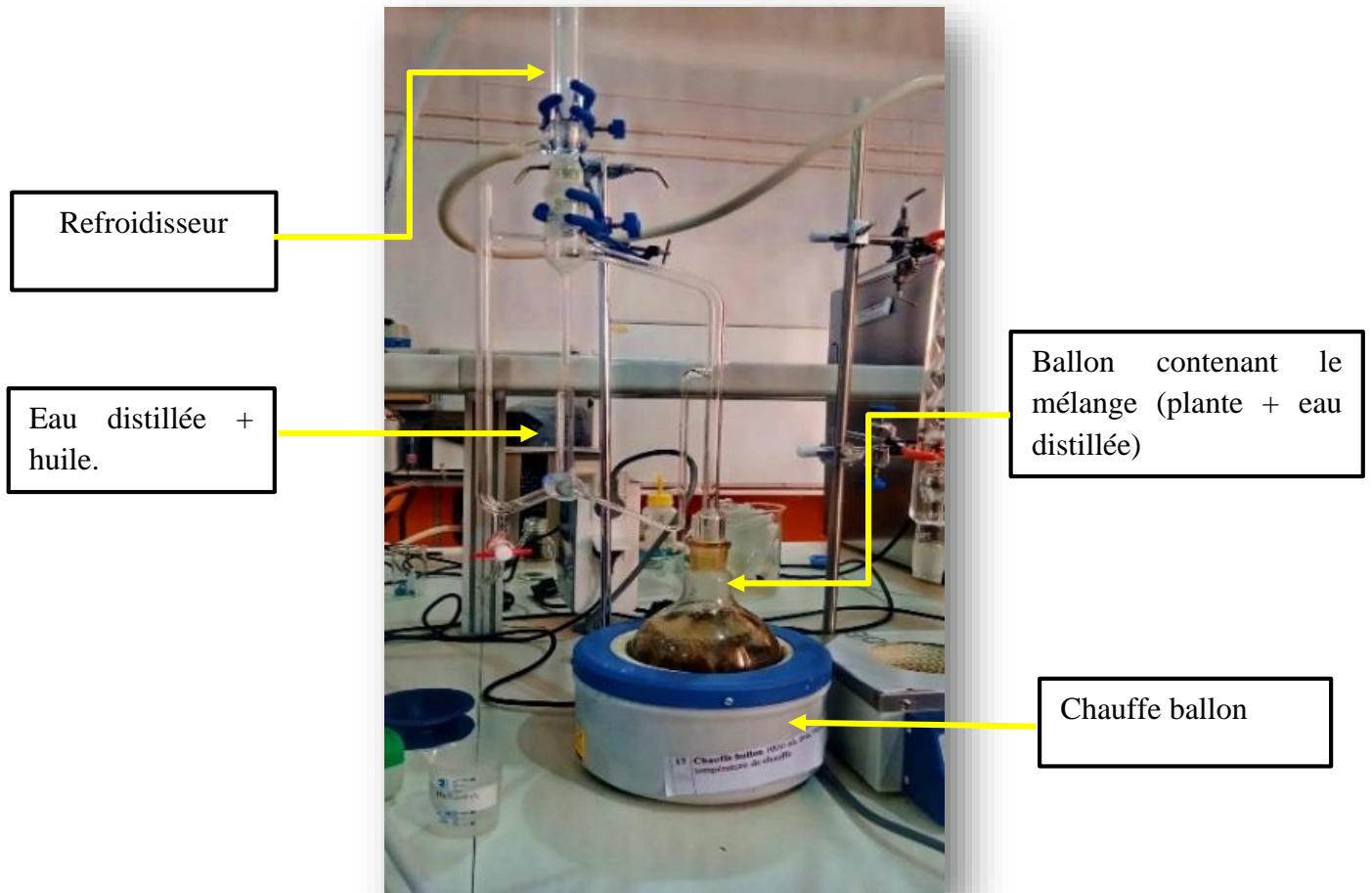


Figure 15: L'hydrodistillateur de types clevenger

### VI.3. Calcul du rendement :

Selon AFNOR (2000), le rendement de l'huile essentielle (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse de matériel végétal sèche utilisé. Ce rendement est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$\text{RHE (\%)} = (\text{Mh/Mv}) \times 100$$

**RHE** : Rendement en huile essentielle en %.

**Mh** : Masse d'huile essentielle en gramme.

**Mv** : Masse de la plante en gramme.

#### **VI.4. Activité antifongique *in vitro* de l'HE :**

L'activité antifongique de HE de *Juniperus phoenicea* a été évaluée sur la croissance mycélienne des isolats (A2, A3, A4, A6) d'*A.pisi* qui ont été révélées une activité enzymatique (amylolytique) importante, selon la méthode de contact direct sur gélose décrite par **Fandoham et al., (2004)** avec des petites modifications. Différentes concentrations en huile essentielle 41,5 ; 42,5 ; 43  $\mu\text{L/mL}$  sont obtenues par addition de 622,5 ; 637,5 ; 645 $\mu\text{L}$  de HE à 14, 37 ; 14, 36 ; 14, 34 de milieu Cz+ amidon 2% à pH6 contenant tween 20 (Sigma 0,5%, v/v). Le mélange (huile essentielle+ Cz+ amidon 2%+ Tween 20 égale 15 ml) est ensuite homogénéisé au vortex puis coulé dans des boîtes de pétri. Des disques mycéliens (6 mm) ont été obtenus à la périphérie des colonies fongiques âgées de 10 jours et placés aseptiquement au milieu des boîtes de pétri avec du milieu Cz+ amidon 2% mélangé à diverses concentrations d'HE avec deux répétitions pour chaque isolat et chaque concentration, pour l'essai témoin le milieu Cz+ amidon 2% additionné au tween 20 mais dépourvu d'HE, l'ensemble des boîtes de pétri ont été incubées à l'obscurité à 22°C pendant 10 jours. A partir du 3<sup>ème</sup> jours, la croissance mycélienne a été contrôlée quotidiennement en mesurant deux diamètres perpendiculaires des colonies.

**Taux d'inhibition de la croissance mycélienne (%)** =  $[(DT - DR) / DT] \times 100$ .

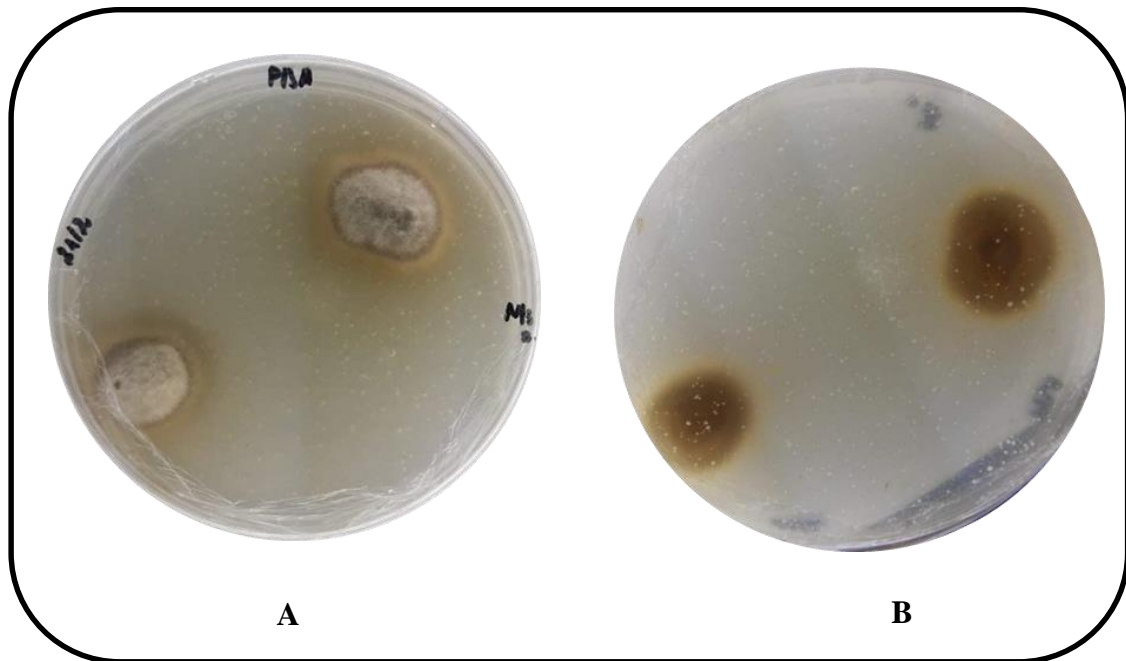
**DT** : est un diamètre moyen (mm) de la colonie fongique de témoin.

**DR** :est le diamètre moyen (mm)de la croissance mycélienne de deux répétition.

**I. Matériel fongique :**

**I.1. Isolement :**

Après l'isolement des fragments nécrotiques présents au niveau des gousses infectées de *Pisum sativum* L., récoltés dans différentes régions. Des souches fongiques se sont développées autour de ces fragments (**Figure 16**).



**Figure 16: Isolement du champignon à partir des gousses, (A: Recto, B: Verso)**

**II. Identification des isolats :**

La purification des souches est faite par la culture monospore (single spore). (les références des isolats et leurs origines sont résumées dans le **Tableau 4**). Après, on procède à la caractérisation macroscopique à l'œil nu (**Tableau 5, Figure 17**) et caractérisation microscopique au microscope optique **Figure 18**.

**Tableau 4 : Origine et dates de prélèvement des échantillons.**

Référence des isolats	Origine	Date de prélèvement	Partie d'isolement
A1	Tlemcen	05/02/2022	Gousse
A2	Tlemcen	05/02/2022	Gousse
A3	Oued souf	08/02/2022	Gousse
A4	Mostaganem	03/02/2022	Gousse
A5	Mascara	08/02/2022	Gousse
A6	Mascara	08/02/2022	Gousse

**II.1. Etude macroscopique :**

**Tableau 5 : Les caractères macroscopique des isolats.**

Isolat	Diamètre de la colonie (cm)	Caractéristiques de la colonie			
		Couleur		Contour	Texture
		Au recto	Au verso		
A1	5	Blanche	Marron-orangé s'éclaircit vers la périphérie.	Régulier	Duveteuse à cotonneuse.
A2	6.3				
A3	5.8				
A4	6.6				
A5	4.55				
A6	5.3				

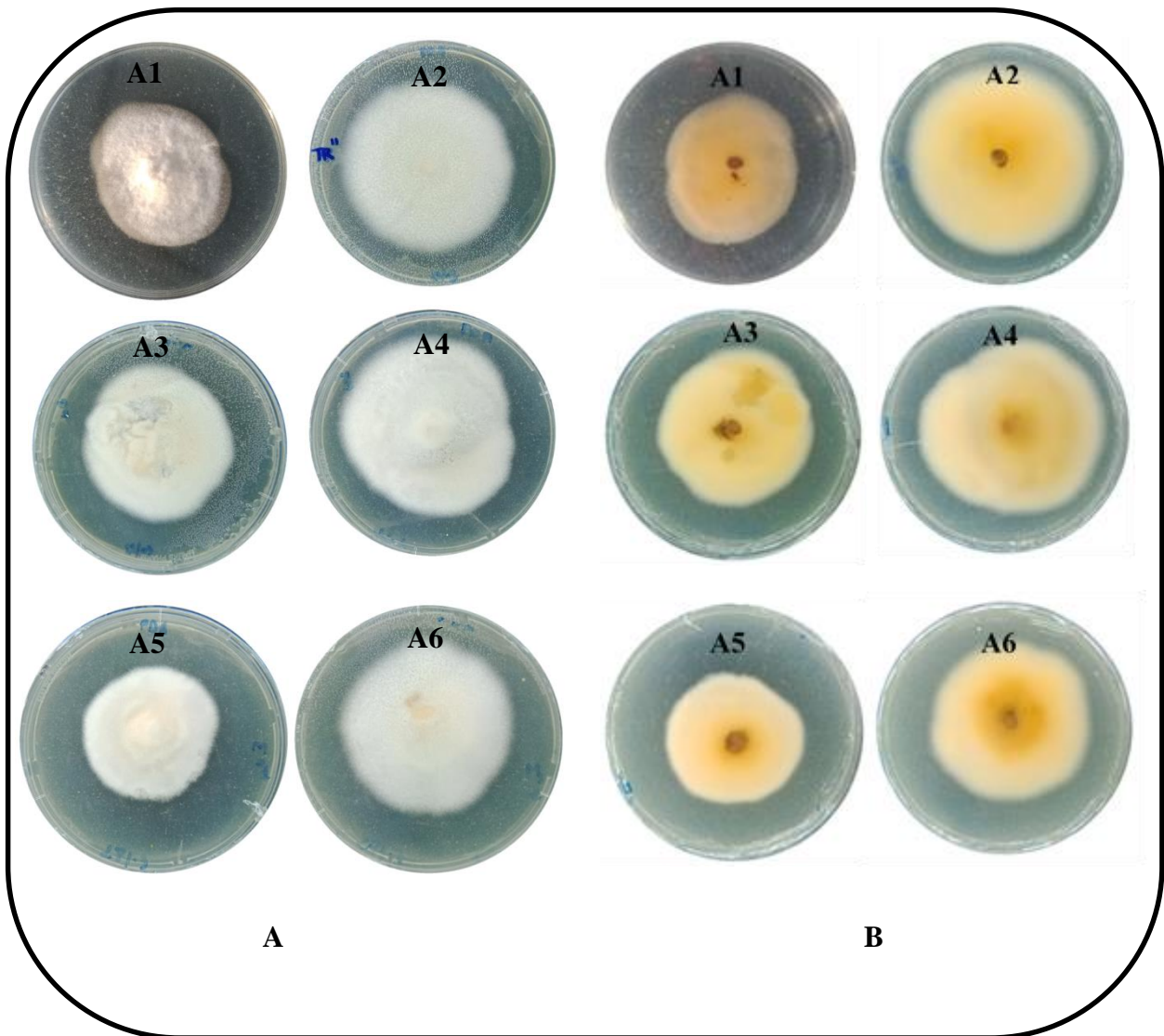


Figure 17: Aspect macroscopique d'*Ascochyta pisi*. (A : Recto ; B : verso)

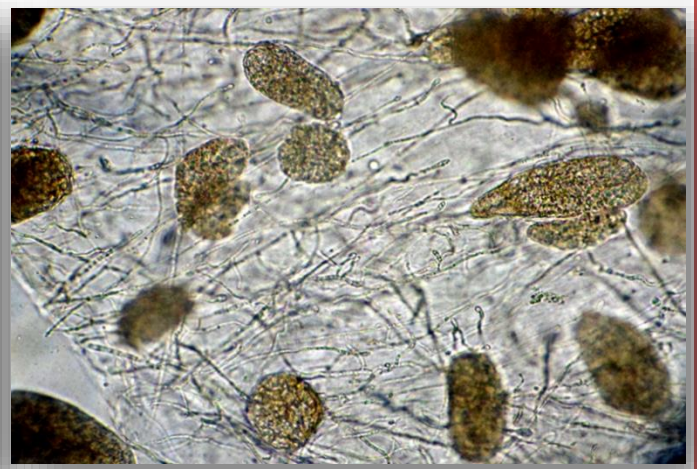
## II.2. Etude microscopique :

L'observation microscopique des isolats d'*Ascochyta pisi* cultivées sur milieu PDA et CLA montre :

- Sur milieu CLA :
  - Un mycélium ramifié et cloisonné.
  - Des pycnidiospores cylindriques, hyalines, arrondies aux extrémités, unicellulaires ou bicellulaires.
- Sur milieu PDA :
  - La présence des pycnides de couleur jaune doré et de forme sphérique.



**A :** Pycnidiospores observées sur milieu CLA au microscope optique (G x100).



**B :** Pycnides observées sur milieu PDA au microscope optique (G x 100).



**C :** Mycélium cloisonné observé sur milieu CLA au microscope optique (G x 100).

**Figure 18:** aspect microscopique d'*Ascochyta pisi* sur milieu PDA et CLA.

### Discussion :

L'apparition des premiers symptômes sur la partie aérienne de pois sous forme des taches a été constaté par certains chercheurs (**Wallen, 1974 ; Lawyer, 1984**) ainsi que l'aspect macroscopique et la couleur des colonies étant des caractères d'identification de l'agent causal *Ascochyta pisi* et sont aussi considérés par certains auteurs comme des caractères de différenciation entre les trois espèces d'antracnose de pois (**Champion, 1997 ; ISTA, 2008**).

D'autre part, la caractérisation microscopique de cette espèce fait l'objet de plusieurs études qui est surtout reconnaissable au microscope optique par la présence de mycélium cloisonné, des spores de formes cylindriques arrondies aux deux extrémités et des pycnides de forme globuleuse avec une couleur brune (**Punithalingham et Gibson, 1972**).

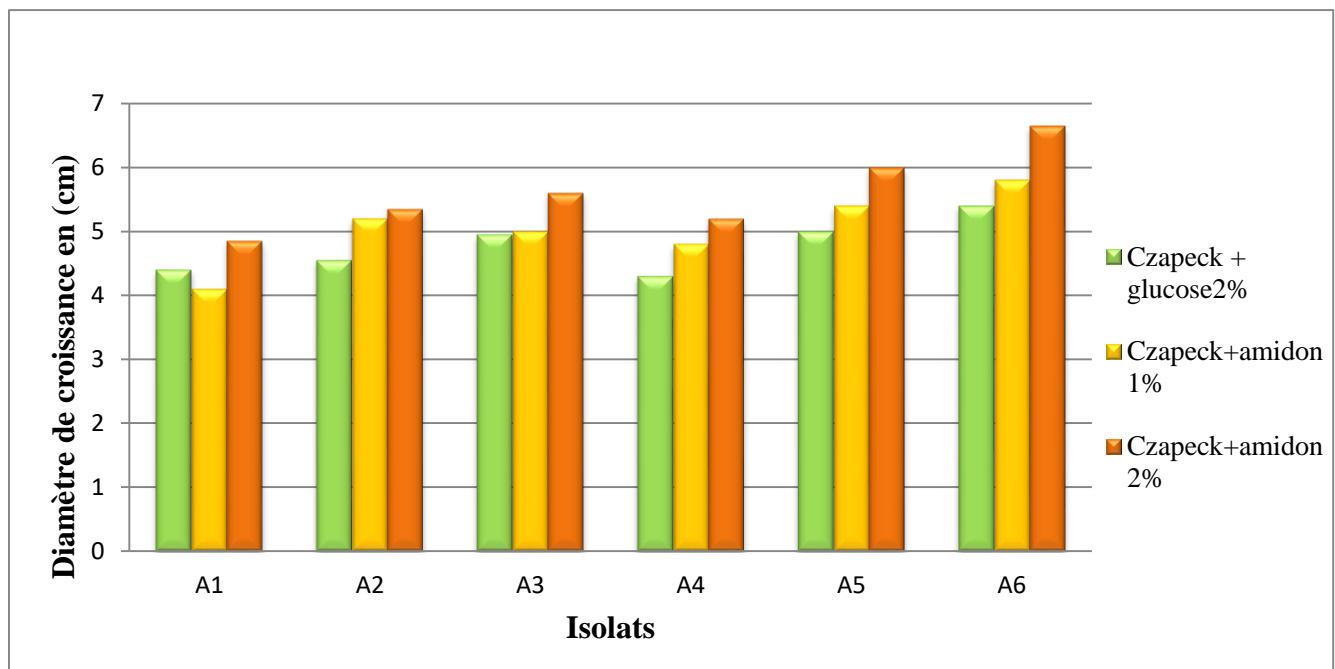
Par ailleurs, l'absence des chlamydo-spores est un caractère intéressant retenu par certains auteurs pour l'identification de l'espèce *Ascochyta pisi* en raison de son présence chez *Ascochyta pinodes* et *Ascochyta pinodella* (**Punithalingham et Holliday, 1972 ; Maufra, 1996; Champion, 1997; Tadjia et al., 2009**).

### III. Etude de l'activité amylolytique :

#### III.1. Recherche de l'activité amylolytique sur milieux solides :

Selon les résultats obtenus les six isolats révèlent une bonne croissance sur les trois milieux : Czapeck + glucose 2%, Czapeck + Amidon 1%, Czapeck+ Amidon 2%.

Les résultats illustrés dans la **Figure 19**, montrent qu'il n'y a pas de différence significative dans la croissance mycélienne entre les deux milieux contenant l'amidon comme seul source de carbone ( Czapeck +Amidon 1% , Czapeck +Amidon 2% ), mais avec une légère préférence pour le milieu Czapeck +Amidon 2% , la souche A1 semble préférer le milieu Czapeck +glucose 2% par rapport au milieu Czapeck +Amidon 1% et la souche A6 se développe beaucoup plus mieux au milieu Czapeck +Amidon 2% avec une croissance diamétrale de 6,65 cm de diamètre après 10 jours d'incubation.



**Figure 19: Les moyennes de la croissance mycélienne des isolats d'*Ascochyta pisi* sur trois milieux ( Czapeck +amidon 1% / Czapeck +amidon 2% /Czapeck +glucose 2%)**

- Selon la **Figure 20** et **21**, les six souches forment des zones de lyse (halo clair) autour des souches fongiques sur les deux milieux (Czapeck +Amidon 1%, Czapeck +Amidon 2%) correspondant à l'hydrolyse de l'amidon par le champignon. Donc, il est capable de produire des enzymes amylasiques qui jouent un rôle dans la dégradation de l'amidon de milieux.
- La mise en évidence de l'activité amylolytique par l'addition de lugol aux cultures des milieux (Czapeck +Amidon 1% , Czapeck +Amidon 2% ) a montré la présence d'une activité amylolytique chez les six isolats traduits par l'apparition de deux zones : une zone de couleur jaune très claire ce qui est témoin de l'hydrolyse d'amidon à un stade poussé (maltose) et une zone de couleur bleue intense témoin de la présence d'amidon (l'amidon n'a pas été hydrolyser par les enzymes car le champignon n'a pas encore atteint cette zone) ces résultats sont illustré dans la **Figure 22** et **Figure 23**.

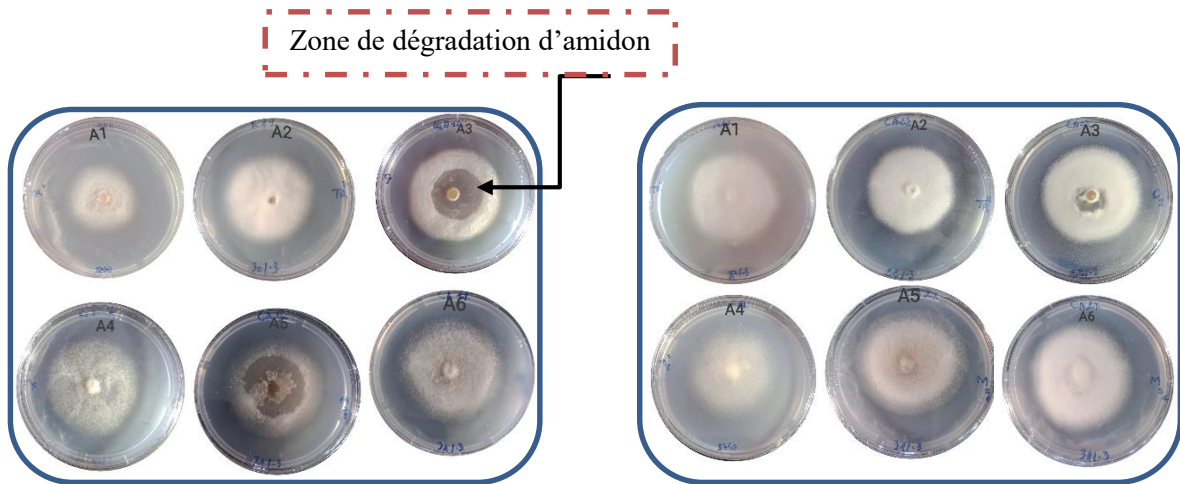


Figure 21: l'activité amylolytique des isolats sur milieu czapeck +amidon 1%

Figure 20: L'activité amylolytique des isolats sur milieu czapeck +amidon 2%.

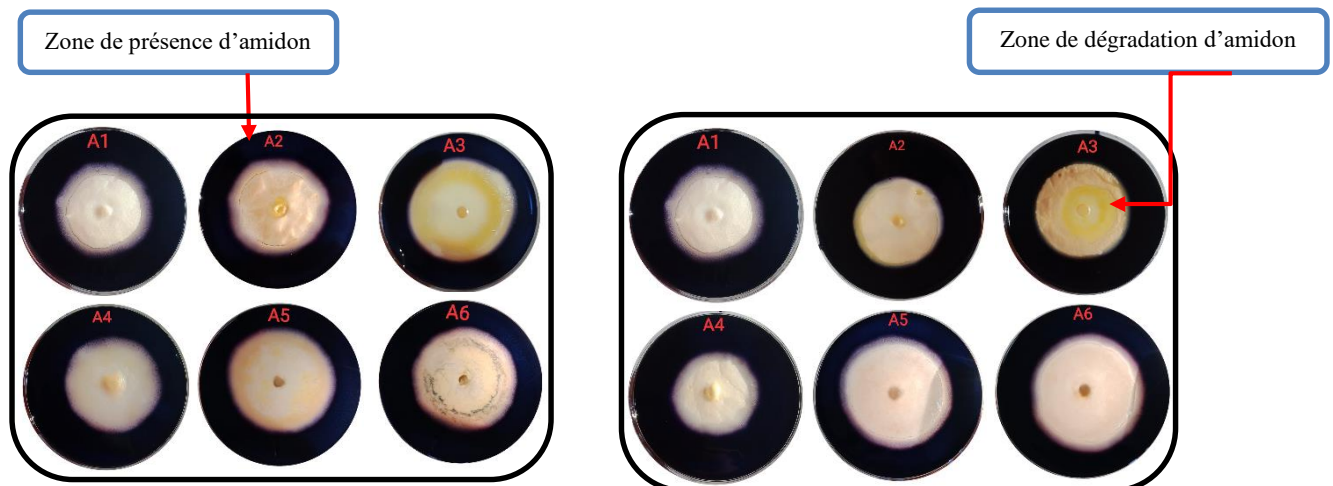


Figure 23: les zone de lyse après l'addition de lugol (czapeck +amidon 1%)

Figure 22: les zones de lyse après l'addition de lugol (czapeck +amidon 2%)

### III.2. Effet de variation du pH sur la croissance mycélienne et l'activité amylolytique :

Selon la **Figure 24**, le pH 6 permet une bonne croissance mycélienne et les six souches révélant une activité amylolytique importante (**Figure 25**), une croissance maximale est observée pour la souche **A6** (6 cm).

Le ph alcalin (pH 8) est favorable à la croissance de tous les isolats, la souche A4 présent une petite préférence au milieu à ph 8 et marquait une croissance optimale (5,35 cm) par apport les deux autres milieu (pH 6 : 5,25 cm et pH 4 : 4,4 cm).

Le ph acide (pH 4) est moins favorable à la croissance mycélienne, l'isolat A5 a enregistré presque le même taux de croissance dans le milieu Czapeck + amidon 2% aux trois pH testés avec une différence de 0,1 cm (pH 4= 4,75 cm ; pH 6 =4,65 cm et ph 8= 4,55 cm).

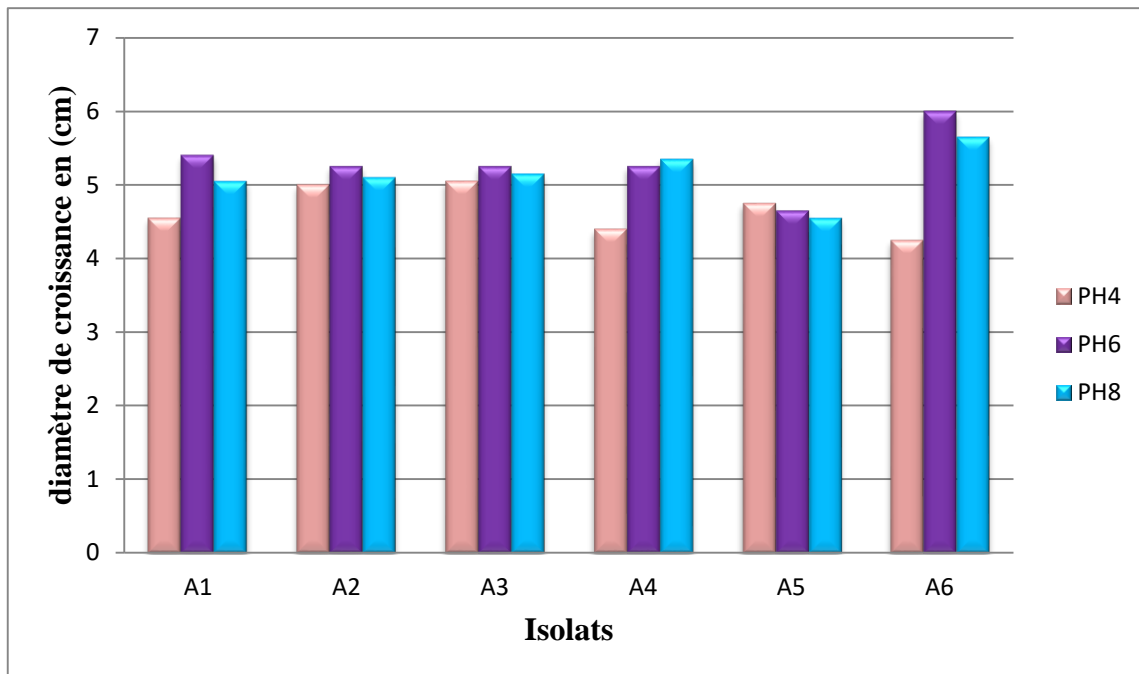


Figure 24: L'effet de différente pH sur la croissance mycélienne et l'activité amylolytique.

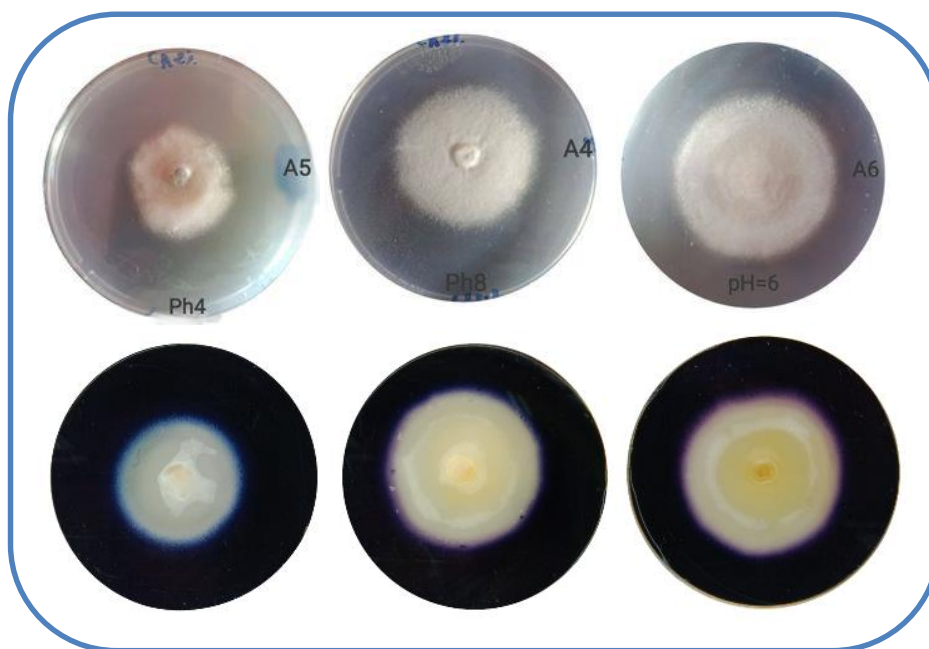


Figure 25: Effet du variation de pH sur la croissance mycélienne et l'activité amylolytique.

**III.3.Optimisation de la croissance mycélienne et de l'activité amylytique sur milieu liquide :**

La biomasse des filtrats de culture des 06 isolats dans le milieu Cz+ amidon à 2% liquide à pH6 a été déterminée après 10 jours d'incubation. Selon le **Tableau 6**, la biomasse fongique des 06 isolats varie selon la souche.

On constate un optimum de croissance chez la souche A6 avec une biomasse de 0.2715 g. En revanche, une faible croissance a été marquée par la souche A3 avec une biomasse de 0,086 g.

**Tableau 6: le poids de la biomasse fongique.**

<b>La souche</b>	<b>La moyenne de poids (g)</b>
<b>A1</b>	<b>0,1275</b>
<b>A2</b>	<b>0,119</b>
<b>A3</b>	<b>0,086</b>
<b>A4</b>	<b>0,1625</b>
<b>A5</b>	<b>0,119</b>
<b>A6</b>	<b>0,2715</b>

### III.3.1. Mise en évidence de l'activité amylolytique par la méthode cup plate :

La technique de cup-plate (**cylinder plate method**) nous a permis de confirmer la présence des amylases dans les filtrats de culture et également d'évaluer le niveau de production d'amylase à pH6.

L'action enzymatique est effectuée par la mesure du diamètre de la zone de lyse émerge autour du puits contenant la culture filtrée après incubation et révélation de lugol (**Figure 26**).

Selon la **Figure 27**, les six isolats produisent des amylases avec différents degrés, le maximum de l'activité amylolytique est observé chez la souche A6 suivi par A5 avec une moyenne de diamètre de zone de lyse atteindre à 1,91 et 1,56 cm, une production modérée des amylases consternant les souches A2, A3 et A4 avec une moyenne de diamètre compris 1 à 1,18 cm et une production minimale d'amylase par la souche A1 avec une moyenne de diamètre 0,95 cm.

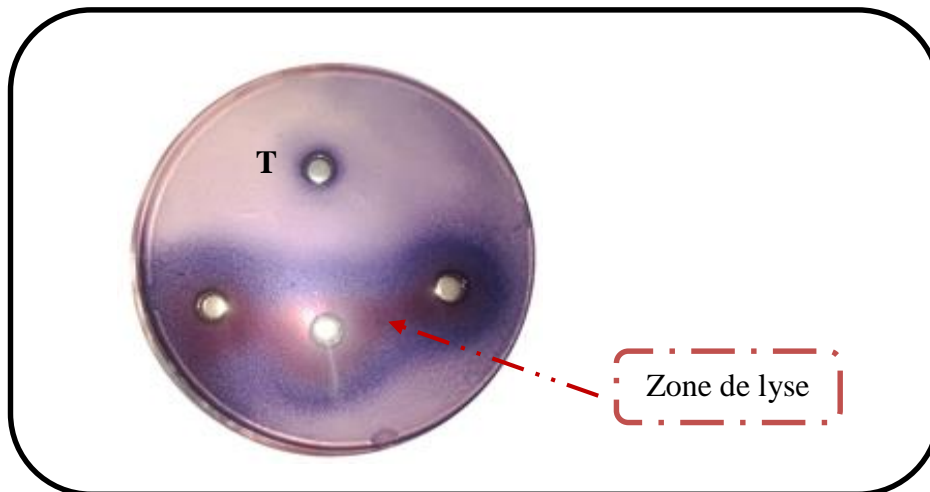


Figure 26: Apparence de zone de lyse par la méthode de cup-plate.

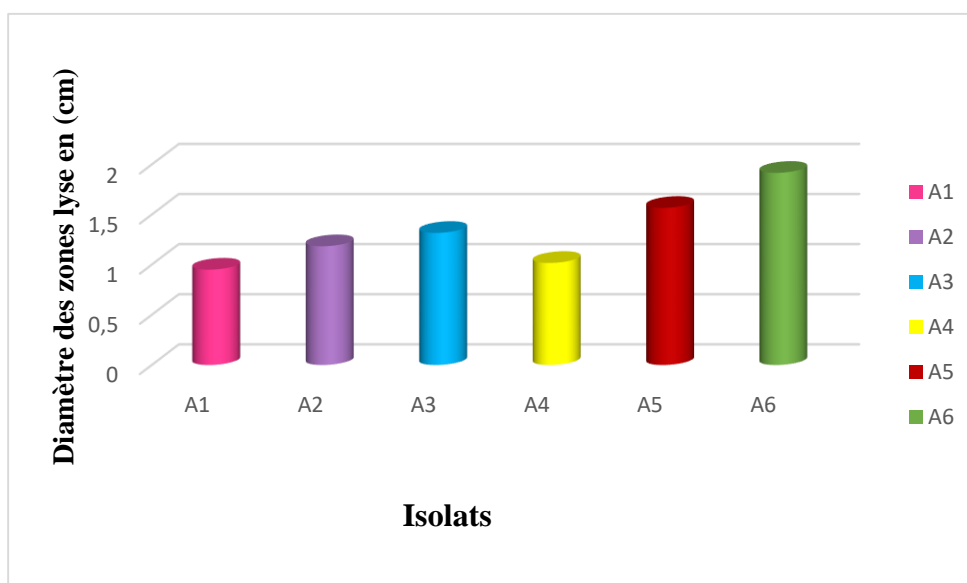


Figure 27: Diamètres en cm des zones de lyse (filtrats de culture du milieu Cz +Amidon 2 à pH=06).

### Discussion :

L'activité amylolytique sur milieu solide (Czapeck modifié avec différentes concentrations d'amidon) est plus forte en milieu amidon à 2%, forte en milieu amidon à 1% et moins forte en milieu glucose à 2%, ceci indique que les amylases sont produites par le champignon d'*Ascochyta pisi*. Ces résultats sont semblables à ceux observés chez *Leucoagaricus Gongylophorus* et certaines espèces d'*Aspergillus*, où la production des amylases en présence d'amidon ou de maltose était plus forte que celle sur le glucose, (**Lachmund et al., 1993 ; Nahas et Waldemarin, 2002 ; Silva, 2006**). Les mêmes observations ont été obtenues par **Yakoubi (2014)** qui a rapporté que l'optimum de croissance pour isolats d'*A.pisi* est enregistré à une concentration d'amidon la plus élevée. Cette possibilité de développement sur un milieu contenant un sucre complexe est liée à leur équipement enzymatique. Également, **Shu et Blackwood (1951)**, dans une étude menée sur *Aspergillus Niger*, ont trouvé que les amylases extracellulaires augmentent considérablement par l'inclusion de l'amidon dans le milieu, une activité amylolytique maximale était observée dans un milieu contenant la plus grande quantité d'amidon. L'amidon induit donc la production des amylases et des maltases (**Mora et Rouland, 1995**).

Parmi les paramètres physico-chimiques du milieu de culture, le pH joue un rôle très important sur la physiologie, la croissance et le développement des champignons (**Lagzouli et al., 2007**). Outre la croissance, le pH joue un rôle primordial dans la production des métabolites et ces variations sont indicatrices des changements dans les activités métaboliques du microorganisme (**Bellon-Maurel et al., 2003**). Nos résultats montrent que les isolats d'*A.pisi* peuvent se développer et présentent une activité amylolytique sur une large gamme de pH allant de 4 à 8. L'optimum de croissance mycélienne et d'activité amylolytique sur milieu solide est enregistré à un pH= 6. Ceci est traduit sur milieu liquide par la présence d'une biomasse fongique et production des amylases au même pH et qui est aussi confirmé par la présence des zones de lyse dans la méthode cup-plate.

Les résultats trouvés montrent qu'il y a un effet de pH de milieu sur la croissance mycélienne et l'activité enzymatique. **Adisa (1985)** a confirmé qu'une croissance maximale est accompagnée avec le rendement amylolytique le plus élevé par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*.

**Berthier et Valla (1998)** ont indiqué que la plupart des champignons se développent à des pH compris entre 3 à 8 et selon **Banerjee et al., (2016)**, le pH du milieu joue un rôle sur la production des enzymes en affectant leurs biosynthèses par la stimulation des processus enzymatiques et le transport de composants à travers la membrane cellulaire. **Fogarty (2012)** a montré que le pH influence la sécrétion des amylases et sa stabilité. Alors, la présence d'activité amylolytique dans un milieu à pH acide (4) et alcalin (8) peut être expliquée par la production de deux types d' $\alpha$ -amylases ce qui confirme les résultats de **Sharma et Satyanarayana (2013)** qui ont démontré l'existence des  $\alpha$ -amylases acides produites à pH compris entre 3 à 5,5 et des amylases neutres produites à pH de 6 à 8.

#### **IV. Évaluation *in vitro* de l'activité antifongique et anti enzymatique d'huile essentielle :**

##### **IV.1. Calcul du rendement :**

Les huiles essentielles des feuilles séchées de *Juniperus phoenicea* extraites par la méthode d'hydrodistillation sont caractérisées par un aspect liquide, une forte odeur et sont de couleur jaune clair. Le rendement d'huile essentielle est : **RHE (%) = 0,39 %** **Figure 28.**



**Figure 28: Huile essentiel de *Juniperus phoenicea***

##### **IV.2.Effet des huiles essentielles sur la croissance mycélienne et l'activité amylolytique :**

L'effet de l'huile essentielle de *J. phoenicea* sur la croissance mycélienne et l'activité amylolytique de l'espèce *Ascochyta pisi*, est déterminé après dix jours d'incubation. L'effet sur la croissance mycélienne a été confirmé par des observations microscopiques des fragments mycéliens sous microscope optique. Les résultats sont résumés dans les tableaux (**Annexe 4**), les **Figure 29 ,29,30**)

###### **➤ Sur la croissance mycélienne :**

On observe que la croissance mycélienne est considérable à partir de 3<sup>ème</sup> jour pour le témoin, alors qu'elle commence après le 4<sup>ème</sup> / 6<sup>ème</sup> jour pour les isolats exposés aux concentrations de 41,5 ; 42,5 µL/mL d'huile essentielle. Selon la **Figure 29 et 30** , l'huile essentielle de *J. phoenicea* a un effet inhibiteur sur la croissance mycélienne qui se traduit par une diminution de diamètre des colonies (aspect macroscopique) et un mycélium moins condensé avec des zones de lyse au niveau de plusieurs sites (aspect microscopique). On note,

une inhibition modérée des différents isolats aux concentrations de 41,5 ; 42,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Pour la concentration 41,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , la souche A3 est inhibée à 70% et une inhibition importante pour cette même concentration est observée chez l'isolat A6 suivi par A4 et A2 avec un taux d'inhibition de 87,5 ; 86,59 et 83,87 % ; respectivement. La concentration de 42,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  a permis une réduction plus ou moins forte que la concentration précédente de la croissance mycélienne, la souche A2 a marqué une inhibition maximale atteinte à 91.12%, suivi par les souches A4 et A6 avec un taux d'inhibition de 88,65 ; 89,88 % autant que la souche A3 a réservé presque le même taux d'inhibition précédant 70 %. Cependant, à la concentration de 43  $\mu\text{L}/\text{mL}$  en HE de *J. phoenicea* on a constaté une inhibition totale de tous les isolats d'*A.pisi*, alors la CMI d'huile de *J. phoenicea* sur la croissance mycélienne du champignon *Ascochyta pisi* est supérieure ou égale 43  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .

### ➤ Sur l'activité amylolytique :

Après l'addition du lugol, on constate que l'huile essentielle de *J. phoenicea* a un impact sur l'activité amylolytique de l'agent pathogène *Ascochyta pisi* qui est inhibée significativement à des concentrations 41,5 et 42,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , avec une zone de lyse comprise entre 0,1 et 1,3 cm pour la concentration de 41,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , et entre 0,1 et 1,25 cm pour la concentration de 42,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  et une inhibition totale de l'activité amylolytique à la concentration de 43  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .

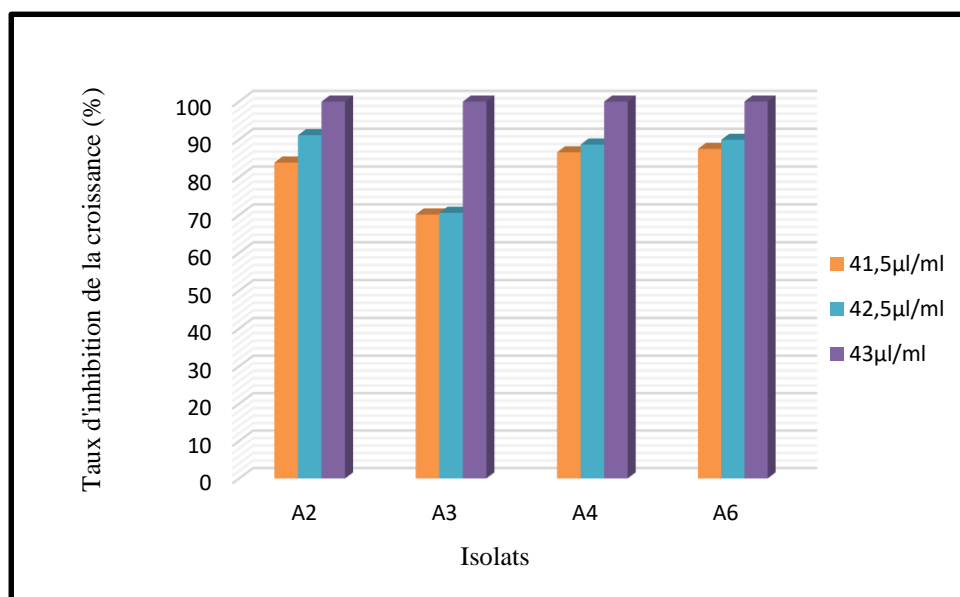
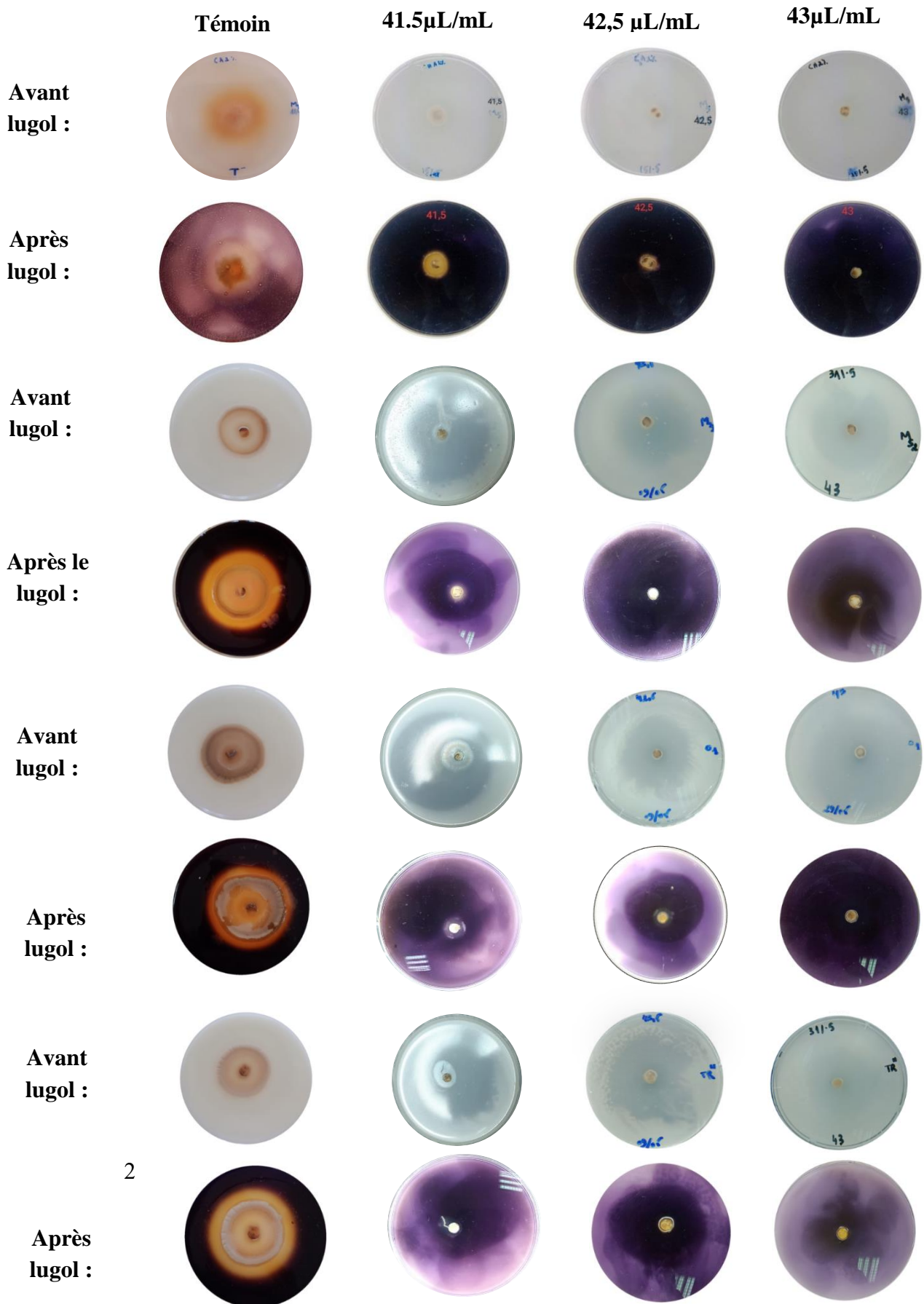
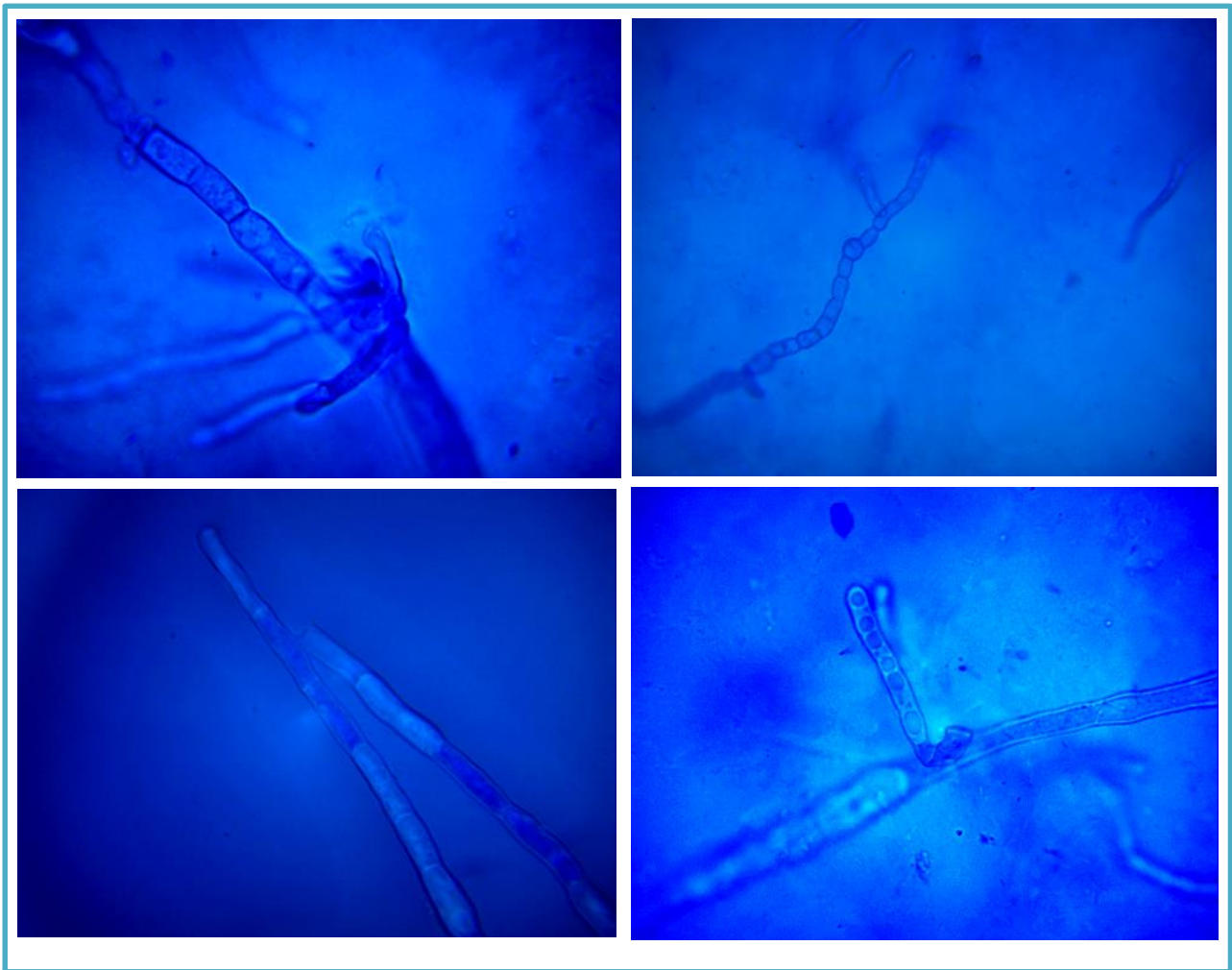


Figure 29: Effet des huiles essentielles sur la croissance mycéliennes d'*Ascochyta pisi*.



2

Figure 30: Effet des huiles essentielles sur l'activité amylolytique



**Figure 30 : Lyse au niveau du mycélium d'Ascochyta pisi en présence d'huile essentielle de *J. phoenicea* à 41.5µl/ml (GX1000)**

### **Discussion :**

Le rendement de l'hydrodistillation des feuilles séchées de *J. phoenicea* est environ 0,39%. Ces résultats sont proches à ceux publiés par **Bouyahyaoui (2017)** qui a obtenu, en utilisant le même procédé d'extraction et la même partie de la plante (Djbel Morghad à Ain sefra), un rendement de 0,6% en HE, et un rendement 0,9% en HE pour la plante récoltée à Founassa. D'autres auteurs ont enregistré un rendement de 0,9% en HE pour la plante de *J. phoenicea* récoltée à la région de Marrakech (Maroc) (**Bahri et al. 2011**).

Par ailleurs, le rendement en huile essentielle est influencé par divers facteurs tels que : la nature et la composition du sol, la température, l'ensoleillement, le climat, la composition

génétique des individus et l'origine géographique de la plante (Achak, 2006 ; Massei *et al.*, 2006).

Les résultats de l'effet d'huile essentielle de *J. phoenicea* sur la croissance mycélienne et l'activité amylolytique de l'espèce *Ascochyta pisi* ont montré une inhibition modérée de la croissance mycélienne et l'activité amylolytique à des concentrations de 41,5 ; 42,5 µl/ml et une inhibition totale pour les quatre (04) isolats à 43 µL/mL. Ceci indique que la concentration minimale inhibitrice de cette HE est supérieure ou égale à 43 µl/ml et l'augmentation de concentration en huile essentielle entraîne une augmentation du taux d'inhibition de la croissance mycélienne. Bien que, dans les résultats précédents on a montré que la croissance mycélienne s'accompagne avec l'activité amylolytique. Alors, l'augmentation de la concentration en huile essentielle conduit aussi à l'augmentation du taux d'inhibition de l'activité amylolytique. Ces résultats concordent avec ceux de **Grande-Tovar *et al.*, (2016)** qui ont signalé les effets de quantité d'HE sur les enzymes hydrolytiques extracellulaires ( $\alpha$ -amylase, protéase, pectinase et activité endo-cellulase). Ces résultats sont aussi confirmés par les études de **Xu *et al.*, (2017)** qui ont montré que l'inhibition de la production de  $\alpha$ -amylase dépendait de la concentration en huile essentielle.

Selon **Oussalah *et al.*, (2006)**, l'activité biologique d'une huile essentielle est relativement liée à sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires et les effets synergiques entre ceux-ci et les composés mineurs. Ceci pourrait expliquer les résultats obtenus par la présente étude.

En effet, l'activité antifongique sur la croissance mycélienne de cette HE peut être liée à la quantité de terpènes et de leurs composés majoritaires ( $\alpha$ -pinène, myrcène,  $\beta$ -pinène, linalol,  $\beta$ -phellandrene et germacrene D). Ces composés possèdent une forte activité antimicrobienne en attaquant à la membrane plasmique, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité et la perte de constituants cellulaires (**Jacob *et al.*, 1979 ; Knobloch *et al.*, 1989 ; Denyer et Hugo, 1991 ; Sikkema *et al.*, 1994**). Le p-cymène ; un composant mineur de HE de de *J. phoenicea* semble également agir sur la membrane cellulaire mais par un autre mécanisme ; il provoque l'expansion des phospholipides membranaires en augmentant les espaces par lesquels des fuites d'ions pourraient avoir lieu (**Ultee *et al.*, 2002**). Les pinènes peuvent augmenter la perméabilité des mitochondries isolées chez les levures (**Uribe *et al.*, 1985**). Par ailleurs, les résultats de cette étude concernant l'inhibition de l'activité amylolytique sont en accord avec certaines études de **Conner et Beuchat (1984) ; Davidson (2001)** qu'ils ont montré que les myrcène, limonène et  $\beta$ -phellandrène (composants majeurs de HE de *J. phoenicea*) peuvent désactiver les enzymes essentielles et perturber la fonctionnalité du matériel génétique, la production d'énergie et la

synthèse des composants structuraux. D'autres huiles essentielles ont montré des effets antifongiques par l'inhibition des activités enzymatiques, tels que l'huile essentielle d'*Austroeupeatorium inulifolium* qui a marqué des effets d'inhibition remarquables sur la production et l'activité des enzymes endo-cellulase,  $\alpha$ -amylase, protéase et pectinase des isolats fongiques aérobies, à savoir *Penicillium*, *Aspergillus* et *Fusarium* (**Grande-Tovar et al., 2016**). Aussi, l'HE de thym, clou de girofle et géranium possédant des activités inhibitrices de l'activité amylolytique pour *Aspergillus Niger*, *A. flavus* et *Rhizopus oryzae* à des différentes concentrations selon HE et la souche (**Geweely, et al., 2020**). **Sarikurkcu et al., (2018)** ont constaté que certains types d'HEs ont une forte activité contre l' $\alpha$ -amylase et la tyrosinase. **Yang et al., (2018)** suggéré que l'huile essentielle possédait l'activité inhibitrice potentielle de l' $\alpha$ -amylase et certains composants peuvent être responsables de son action.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette étude, menés au laboratoire de microbiologie appliqué du centre universitaire SALHI Ahmed de Naama, ont pour objectifs d'apprendre des connaissances sur le champignon *Ascochyta pisi* provoquant la maladie de l'antracnose de pois et de rechercher une méthode de lutte contre cet agent pathogène.

Les inconvénients de la lutte chimique par les fongicides sur la santé humaine et l'environnement, nous ont conduit à étudier l'efficacité de l'huile essentielle d'une plante aromatique et médicinale contre l'agent pathogène *A.pisi*.

L'isolement du champignon à partir des gousses nécrosées de pois provenant de différentes régions d'Algérie, a permis d'obtenir six souches fongiques.

L'identification des isolats obtenus par l'étude macroscopique et microscopique, a été faite selon des caractères cultureux (aspect de mycélium, couleur des colonies et vitesse de croissance) et des caractères microscopiques (forme des spores et des pycnides). Ces caractérisations nous ont permis de confirmer l'appartenance de ce pathogène à l'espèce *Ascochyta pisi*.

La recherche des activités enzymatiques sur milieu solide Cz + amidon 2% aux différents pH, nous a permis de mettre en évidence la présence d'un groupe de métabolite protéique responsable de la dégradation des réserves cellulaires de l'hôte : les amylases. La production de ces derniers est influencée par des facteurs liés d'une part au pathogène et d'autre part aux conditions du milieu tel que le pH. Les résultats d'optimisation de l'activité amylolytique en filtrat de culture ont confirmé la production optimale des amylases à pH 6.

La lutte biologique contre l'agent pathogène *Ascochyta pisi* consiste à l'extraction d'huile essentielle à partir des feuilles séchées de *Juniperus phoenicea*, le rendement de ce dernier est 0,39%.

Les effets antifongiques des HEs de *J. phoenicea* *in vitro*, sur la croissance mycélienne et l'activité amylolytique, ont montré une inhibition modérée de l'activité amylolytique à des concentrations de 41,5 ; 42,5  $\mu\text{L/mL}$  et une inhibition totale pour les quatre isolats à 43  $\mu\text{L/mL}$ .

Les résultats obtenus dans cette étude ont démontré l'intérêt de cette plante comme source de nouveaux produits naturels à activité antifongique contre le pathogène *Ascochyta pisi*.

Cependant, il serait intéressant de poursuivre cette étude par le dosage de l'activité amylolytique, purification des enzymes amylase, pour suivre la recherche de l'effet antifongique de HE *in vivo*, étudier l'effet de chaque fraction de HE sur l'activité enzymatique par la suite étudier la faisabilité de la commercialisation des produits antifongiques à base d'HE de *Juniperus phoenicea*.

Abdelli W. 2017. Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et de *Thymus vulgaris*.Thèse de Doctorat, Université de Mostaganem.7-27p.

Achak N.2006. contribution à la valorisation des substances naturelles: Etude des huiles essentielles des cupressacées de la région tensif Al haouz-Marrakech.These de Doctorat, Université Kaddy ayad. 240 p.

Adams R. P. 1998. The leaf essential oils and chemotaxonomy of *Juniperus* sect. *Juniperus*. *Biochemical Systematics and ecology*. 26(6): 637-645.

Adams R. P. 2004. *Juniperus of the world*. Vancouver: Trafford Publishing Co.

Adams R. P., Arista M., Boratynski A., Habib Houari H., Leschner H., Liber Z., Minissale P., Sciandrello S., Mataraci T. 2014. Geographic variation in the leaf essential oil of *Juniperus turbinata* from throughout its range in the Mediterranean. *Phytologia*. 96: 149-158.

Adisa V.1985. Some extracellular enzymes associated with two tomato fruit spoilage molds. *Mycopathologia*. 91(2): 101-108.

Allard C., Bill L., Touraud G.et al.1993. L'antracnose du pois. *Revue bibliographique et synthèse*. *Agronomie*. 13(1): 5-24.

Allescher A. 1901. *Fungi imperfecti*. In: Rabenhorst's *Kryptogamen-Flora von Deutschland, Oesterreich und der Schweiz*: 1 (6), 1016 p.

Arias-rivas B., Megee D.C., Burris J.S. 1998. Corn seed treatment with polymers for controlling *Pythium* spp. *Fi-topatol.Venez*. 11:10-15.

Arraiza M.P., González-Coloma A., Andres M.F., Berrocal-Lobo M., Domínguez-Núñez J.A., Da Costa Junior A.C., Navarro-Rocha J ., Calderón-Guerrero C. 2018. Antifungal Effect of Essential Oils : Potential of Essential Oils .Edited by Hany A. El-Shemy. Chapter 8 : 146-164.

Aveskamp M., De Gruyter, 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): 1-60.

Bahri F., Romane A. R., Arjouni Y., Harrak R., Ahmed El Alaoui F. 2011. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of Moroccan *Juniperus phoenicea*. *Natural product communications*. 6(10): 1934578X1100601027.

Baka Z.A., Rashad Y.M. 2016. Alternative control of early blight disease of tomato using the plant extracts of *Acacia nilotica*, *Achillea fragrantissima* and *Calotropis procera*. *Phytopathol. Mediterr.* 55: 121-129.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*. 46(2):446-475.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Zhiri A., Baudoux D., Idaomar M. 2006. Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 606 (1-2): 27-38.

Bateman D., Basham H. 1976. Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. *Physiological plant pathology*. Springer. 316-355.

Banerjee S., Maiti T. K., Roy R. N. 2016. Identification and product optimization of amylolytic *Rhodococcus opacus* GAA 31.1 isolated from gut of *Gryllotalpa africana*. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*. 14(1): 133p.

Belghit M. 2016. Recherche des huiles essentielles de plantes inhibitrices de quelques entérobactéries résistantes aux antibiotiques. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie, Biotechnologie des microorganismes, Mostaganem. 15p.

Bellakhdar J. 1997. Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle au Maroc: la situation actuelle, les produits, les sources du savoir (enquête ethnopharmacologique de terrain réalisée de 1969 à 1992), Université Paul Verlaine-Metz.

Bellon-Maurel V., Orliac O., Christen P. 2003. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochemistry*. 38(6): 881-896.

Benabid A. 2000. Flore et écosystèmes du Maroc. Evaluation et préservation de la biodiversité. Ibis Press, Paris, 360p

Bernard T, Sabine B. 2007. Comparison of the epidemiology of ascochyta blights on grain legumes . B. Tivoli A., Baranger F. J. Muehlbauer., B. M. Cooke. Dordrecht, Springer Netherlands: 59-76p.

Berthier J., Valla G. 1998 .Moisissures – Mycotoxines et Aliments : du Risque à la Prévention’, Université Claude Bernard, Lyon I, pp. 16- 28.

Besombes C. 2008. Contribution à l’étude des phénomènes d’extraction hydro-thermo-mécanique d’herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle, France. 289p.

Blaise K., Couture L., Dostaler D., Berner L. 2001. Variabilité phénétique du colletotrichum graminicola du sorgho. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23(2), 138-145.

Bond D., Pope M. 1980. Ascochyta fabae on winter beans (Vicia faba): pathogen spread and variation in host resistance. *Plant Pathology*. 29(2): 59-65.

Bonnier G. 1931. Flore complète illustrée en couleurs de France, Suisse et Belgique. Tome onzième.27-38.

Boudjelal A., Henchiri C., Sarri D., Hendel N., Benkhaled A., Ruberto G. 2013. Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey. *Journal of ethnopharmacology*. 148(2): 395-402.

Bouyahyaoui A. 2017. Contribution à la valorisation des substances naturelles: Etude des huiles essentielles des cupressacées de la région de l’Atlas algérien. Thèse de Doctorat, Université de Mostaganem (Algérie).18-60.

Bouzabata A. 2013. Traditional treatment of high blood pressure and diabetes in Souk Ahras District. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy* .5(1): 12-20.

Bouznad Z. 1989. Contribution à la connaissance du genre *Ascochyta* cas particulier de l'étude biologique ultra structurale et cytochimiques des relations hôte-parasite chez le couple *Pisum sativum* / *Ascochyta pisi* Lib. Thèse doctorat Université Pierre et Marie Curie. Paris (FR), 217 p.

Bretag T. W. 1991. Epidemiology and control of *Ascochyta* blight of Field Peas. PhD Thesis. La Trobe University, Australia.4-6.

Brink M., Belay G.M. 2006. Céréales et légumes secs, PROTA.

Brochant de Villers A.J.F.M., Brongniart A., Turpin P.J.F., Cuvier F.G., Cloquet H., Dumériel A.M.C., Ducrotay de Blainville H.M., Desmarest A.-G. 2008. Dictionnaire des sciences naturelles. Volume 18, Edition Levrault, Paris, 594p.

Bruneton J. 1999. Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Tec & Doc. Lavoisier, Paris. 1120p.

Bruneton J. 2009. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4ème édition, Tec & Doc, Lavoisier, Paris. 1292p.

Buckle J. 1997. Clinical aromatherapy. Essential oils in practice 2nd ed. United States of America. 424 p.

Burstin J., Kreplak J., Macas J., Lichtenzveig J. 2020. *Pisum sativum* (Pea). Trends in Genetics. 36(4): 312-313.

Carrouee A., Girad M. 1994. Pois protéagineux. Techniques agricoles, Editions Techniques - Techniques Agricoles. Fascicule 2212.

Champion R. 1997. Identifier les champignons transmis par les semences. édition :Quae. 398 p.

Chazel M., Chazel L. 2012. Découverte naturaliste des garrigues. Quae édition, 208p

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 Y., Zeng H., Tian J., Ban X., Ma B., Wang Y. 2013. Antifungal mechanism of essential oil from *Anethum graveolens* seeds against *Candida albicans*. *Journal of medical microbiology*. 62(8): 1175-1183.

Chermat S., Gharzouli R. 2015. Ethnobotanical study of medicinal flora in the North East of Algeria-An empirical knowledge in Djebel Zdim (Setif). *J Mater Sci Eng* 5: 50-59.

Conner D., Beuchat L. 1984. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of food science*. 49(2): 429-434.

Cousin R. 1996. Le pois: variabilité, objectifs de sélection. *Sauve qui Peut! Sauve qui Veut*.(8): 13-17.

Cousin R., Bannerot H. 1992. Amélioration des espèces végétales cultivées. INRA Editions, Paris, France. pp 173–188.

Crosson P. 2006. Maladies aériennes du pois: rester vigilant sur pois d'hiver. *Perspectives agricoles*.(321): 70-74.

Cruickshank I., Perrin D. 1960. Isolation of a phytoalexin from *Pisum sativum* L. *Nature*. 187(4739): 799-800.

Cruickshank I., Perrin D. 1961. Studies on Phytoalexins III. The Isolation, Assay, and General Properties of a Phytoalexin From *Pisum Sativum* L. *Australian Journal of Biological Sciences*. 14(3): 336-348.

Davidson P. 2001. Chemical preservatives and naturally antimicrobial compounds cit Celikel N. And Kavas G. 2008. antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech J. Food Sci*. 26(3): 174-181.

Davies D., Berry G., Heath M., Dawkins T. 1985. Pea (*Pisum sativum* L.). 147-198. In: R.J. Summerfield and EH Roberts, (eds.), Williams Collins Sons and Co. Ltd, London, UK.

Dekker J. 1957. Internal seed disinfection of peas infected by *Ascochyta pisi* by means of the antibiotics rimocidin and pimaricin and some aspects of the parasitism of this fungus. *Neth J Plant Pathol.* 63: 65-144.

Denyer S., Hugo W. 1991. Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. *Society for Applied Bacteriology. Technical Series.* 27: 171-187.

Dorrance A., Berry S., Lipps P. E. 2004. Characterization of *Pythium* spp. from three Ohio fields for pathogenicity on corn and soybean and metalaxyl sensitivity. *Plant Health Progress.* 5(1): 10.

Doymaz I., Kucuk I. 2017. Pretreatments and temperature effects on the drying kinetics of peas. *Bulgarian Chemical Communications.* 49(1): 90-97.

Ekinci M. S., Dalfesoglu A. K., Ozkose E. 2017. Effects of essential oils supplementation on survival rate and lignocellulolytic enzyme activities of rumen fungi isolated from cattle. *Kahramanmaras Sutcu Imam Univ J Nat Sci* 20.2235-41.

Elzebroek T., Wind K. 2008. *Guide to cultivated plants.* CAB International, Oxfordshire, UK enzymology. New York: Academic Press. (1):149-158

Eslahi H., Fahimi N., Sardarian A.R. 2018. Chemical composition of essential oils in: *Essential Oils in Food Processing Chemistry, Safety and Applications.* Hashemi, S.M.B., Khaneghah, A.M. and de Souza Sant'Ana A. (eds.) John Wiley & Sons Ltd. New Jersey, pp.119-157

Essawi T., Srour M. 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of ethnopharmacology.* 70(3): 343-349.

Fandohan P., Gbenou J.D., Gnonlonfin B., Hell K., Marasas W. F., Wingfield M. J. 2004. Effect of essential oils on the growth of *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in corn. *Journal of agricultural and food chemistry.* 52(22): 6824-6829.

FAO. 2017. Food and alimentation organization. Sur le site:<http://www.fao.org/faostat/fr/#data>. Consulté le 15-04-2019.

FAO. 2021. Food and alimentation organization. Sur le site <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Consulté le 18-02-2022

Faris-Mokaiesh S., Boccara M., Denis J. B., Derrien A., Spire D. 1996. Differentiation of the Ascochyta complex fungi of pea by biochemical and molecular markers. *Current Genetics* .29(2): 182-190.

Fillatre Y. 2011. Produits phytosanitaires: Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem. Thèse de Doctorat ,Université d'Angers. France, 288p

Fogarty, W.M. 1983. Microbial Amylases. In *Microbial Enzymes and Biotechnology*. (eds). Applied Science Publishers Ltd., London, UK .pp 1-92.

Freires, I. d. A., Murata R. M., Furletti V. F., Sartoratto A., Alencar S. M. D., Figueira G. M., Janaina A. O. R., Marta C. T. D., Pedro L. R. 2014. *Coriandrum sativum* L.(coriander) essential oil: antifungal activity and mode of action on *Candida* spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. *PLoS One* 9(6): e99086.

Franchomme P., Penoel D. 1990. L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois. Limoges, France. 445p.

Furgal-Węgrzycka H., Węgrzycki M. 2009. Genotypic population structure of *Ascochyta* pinodes and *Phoma* pinodella in Poland. *Plant breeding and seed science*. 59: 21-52.

Grande-Tovar C. D., Chaves-Lopez C., Viuda-Martos M., Delgado-Ospina A. S J., Perez-Alvarez J.A., Ospina N., La Tora S., Palmieri S., Paparella A. 2016. Sub-lethal concentrations of Colombian *Austroepatorium inulifolium* (HBK) essential oil and its effect on fungal growth and the production of enzymes. *Industrial Crops and Products*. 87: 315-323.

Gregory P. H., Guthrie E. J., Bunce M. E. 1959. Experiments on splash dispersal of fungus spores. *Microbiology*. 20(2): 328-354.

Grubben G. J. H. 2006. Légumes-ressources végétales d'Afrique tropicales (2), fondation porota, wageningen, pays-bas. 475p.

Gupta A., Gupta V. 2008. Production and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology*. 7(3): 551-556.

Hamedo H., El Shamy A. 2008. Effect of essential oil of *Eucalyptus rostrata* on the production of some enzymes by *Trichoderma virens* and *Fusarium solani*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2(4): 1223-1227.

Haque E., Irfan S. 2016. Terpenoids with antifungal activity trigger mitochondrial dysfunction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 85(4): 436-443.

Hare W.W., Walker J.C. 1944. *Ascochyta* diseases of canning pea Wisconsin Agricultural Experiment station research Bulletin. 150.31pp.

Harrewijn P., Van Oosten A. M., Piron P. G. M. 2001. Natural terpenoids as messengers. A multidisciplinary study of their production, biological functions and practical applications. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 440 p.

Heath M., Wood R. 1969. Leaf spots induced by *Ascochyta pisi* and *Mycosphaerella pinodes*. *Annals of Botany* .33. 657-670.

Heath M., Wood R. 1971. role of cell wall degrading enzymes in the development of leaf spots caused by *Ascochyta pisi* and *Mycosphaerella pinodes*. *Ann Bot NS* .35(2) : 451-474.

Hernandez-Ochoa L.R. 2005. Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné « Solvant/Actif ». D'origine végétale. Thèse de doctorat. Institut National Polytechniques de Toulouse. France.15-32.

Hu Y., Zhang J., Kong W., Zhao G., Yang M. 2007. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. *Food Chem.* 220. 1–8.

Huguette M. 2008. La route des épices, aromats, condiments et mélange d'épices. Edition Sang de la terre, Paris. 190p.

Hulin V., Mathot A.G., Mafart P., Dufossé L. 1998. Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments*, 18(6), 563-582p

ISTA ( International Seed Testing Association) .2008.Rule 7-005 : Detection of *Ascochyta pisi* on *Pisum Sativum* (Pea).

Jacob M., Pellecuer J., Tomei R. 1979. Centre régional d'étude et de développement des plantes à usage pharmaceutique. *Rivista Italiana EPPOS.* 11. 26-30.

Jones L.K. 1927. Studies of the nature and control by blight. leaf and pod spot.and foot rot of peas caused by species of *Ascochyta*,N.YAgri.Expt.Sta.Bull:547.1-166p.

Jaume Saint-Hilaire J.H. 2010. Plantes de la France: décrites et peintes d'après nature. Volume7. Edition Chez l'auteur. Paris. 360p

Kabir A.H., Paltridge N.G., Able A.J., Paull J.G., Stangoulis J.C. 2012. Naturel variation for Fe-efficiency is associated with upregulation of Strategy I mechanisms and enhanced citrate and ethylene synthesis in *Pisum sativum* L. *Planta.* 235. 1409-1419.

Kaboré B. K., Couture L. 2001. Variabilité phénétique du *Colletotrichum graminicola* du sorgho. *Canadian Journal of Plant Pathology.* 23(2): 138-145.

Kasmi M., Aourach M., El Boukari M., Barrijal S., Essalmani H. 2018. Effectiveness of aqueous extracts of aromatic and medicinal plants against Gray mold of tomatoes in Morocco.C.R. Biol. 340(8): 386-393.

Kerekes E.B., Deák E. 2013. Anti - biofilm forming and anti - quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food - related micro - organisms. *Journal of Applied Microbiology.* 115(4): 933-942.

Khalfi-Habes O. 2007. Evaluation du potentiel biocide et étude de l'influence de la composition des huiles essentielles de quelques plantes algériennes sur *Rhyzoperthadominica* (F) (Coleoptera : Bostrichidae) et *Callosobruchus maculatus* (F) (Coleoptera:Bostrychidae). Thèse de doctorat, Institut nationale agronomique-el Harrach. Alger. P119.

Knobloch K., Pauli P., Iberl B., Weigand H., Weis N. 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1, 603-608 .

Labrousse F. 1931. L'antracnose du pois-chiche. *Rev. Path. Entom. agric.* 18, 226-231

Lachmund A., Urmann U. 1993. Regulation of  $\alpha$ -amylase formation in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus nidulans* transformants. *Current Microbiology*. 26(1): 47-51.

Lagzouli M., Mennane Z., Aitounejjar A., EL kettani Y., ELYachoui M., Ouhssein E M., Berny E.H., Jadal M. 2007. Optimization of composition of media for the production of extracellular glucoamylase by *Candida guilliermii*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*.10(19): 3322-3329.

Lang G., Buchbauer G. 2012. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragr. J.* 27 . 13–39

Lawyer A. 1984. Foliar diseases caused by fungi. *Compendium of Pea Diseases*, Am. Phytopathol. Soc. St. Paul. MN. 11-15.

Leslie J.F., summerell B.A., 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Edit. Blackwell Publishing Professional. 388 p.

Lucchesi M.E. 2005. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat en Sciences, Université de la Réunion, France. 146p

Maatooq G.T., El-Sharkawy S.H., Afifi M.S., Risazza J.Pn. 1998. Flavonoid From Cupressaceae Plants. *Natural Product Sciences*. 4(2) : 9-14 .

Marouf A., Tremblin G. 2015. ABRÉVIATIONS, SYMBOLES ET ACRONYMES. Abrégé de biochimie appliquée. EDP Sciences. 1-6.

Maude R. 1966. Pea Seed infection by *Mycosphaerella pinodes* and *Ascochyta pisi* and its control by seeds Soaks in Thiram and captan suspensions. *Ann Appl Biol.* 57 . 193-200 .

Maufras J.Y . 1996. L'anthracnose. *Prespectives agricoles* .22 :6-17.

Mel'nik V. A. 2000. Key to the fungi of the genus *Ascochyta* Lib.(Coelomycetes), Parey.

Messiaen C.M., Blancard D., Lafon R., Rouxel, F. 1991. Les maladies des plantes maraîchères. INRA éditions, 3ème édition. 291-305.

Miara M. D., Bendif H., Rebbas K., Rabah B., Hammou M. A., Maggi F. 2019. Medicinal plants and their traditional uses in the highland region of Bordj Bou Arreridj (Northeast Algeria). *Journal of Herbal Medicine.* 16: 100262.

Michail S., Farhan M.A., Husain S. S . 1983. Sources of broad bean infection by *Ascochyta fabae* in Ninevah province of Iraq. *Seed science and technology* .11(2): 393-402.

Monties B.1980. Les polymères végétaux: polymères pariétaux et alimentaires non azotés. *Biochimie Appliquée*. Collection Gauthier-Villard, Paris, France.14-26.

Moore C. W., Del Valle R., McKoy J., Pramanik A., Gordon R. E.1992. Lesions and preferential initial localization of [S-methyl-3H] bleomycin A2 on *Saccharomyces cerevisiae* cell walls and membranes." *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 36(11): 2497-2505.

Mora P., Rouland C.1995. Comparison of hydrolytic enzymes produced during growth on carbohydrate substrates by *Termitomyces* associates of *Pseudacanthotermes spiniger* and *Microtermes subhyalinus* (Isoptera: Termitidae). *Sociobiology (USA)*.26(1): 39-53.

Morkunas I., Formela M., Marczak L., Stobiecki M., Bednarski, W. 2012. The mobilization of defence mechanisms in the early stages of pea seed germination against *Ascochyta pisi* Department of plant physiology, protoplasma.250 :63-75.

Msaada K., Salem N., Tammar S., Hammami M., Saharkhiz M J., Debiche N., Limam F., Marzouk B. (2012). Essential oil composition of *Lavandula dentata*, *L. stoechas* and *L. multifida* cultivated in Tunisia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 15(6): 1030-1039.

Nahas E., Waldemarin M.M. 2002. Control of amylase production and growth characteristics of *Aspergillus ochraceus*. *Revista latinoamericana de Microbiologia*.44(1): 5-10.

Nasraoui B., Lepoivre P., Barthelemy JP., Semal J. 1990. Evidence of cutinase activity released by *Ascochyta pinodes* and *Ascochyta pisi*. *Mededelingen van de Faculteit van de Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent*. 55: 835—842

Nazzaro F., Fratianni F., Coppola R., Feo V.2017. Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals*.10 (4): 86

Nguyen Q. D., Rezessy-Szabó J. M., Claeysens M., Stals I., Hoschke Á. 2002. Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. *Enzyme and Microbial Technology*. 31(3): 345-352.

Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M. 2006. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat science*. 73(2): 236-244.

Petrak F. 1923. Mykologische Notizen. VI. Numbers 201-300. *Ann. mycol.* 21: 182-335.

Punithalingam E., Gibson I. 1972. *Ascochyta pisi* C.M.I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. 1–2.

Punithalingam E., Gibson I. 1976. *Potrebniamyces coniferarum*. [Descriptions of Fungi and Bacteria]. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria* (52).

Punithalingam E., Holliday P. 1972. *Mycosphaerella pinodes* CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. no. 340.

Quezel P., Santa S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, 2 Tomes. Ed. Centre National de la Recherche Scientifique. Paris, 1170p.

Rameau J.-C., Mansion D., Dume G. 2008. Flore forestière française : guide écologique illustré. Région méditerranéenne. Forêt privée française, Volume 3, 2426p.

Regnault-Roger C., Vincent C., Arnason J. T. 2012. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annual review of entomology*.57: 405-424.

Richard H. 1992. Epices et aromates. Edition Tec & Doc. Lavoisier, Paris. 339p.

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

Rouxel T. 1989. Les phytoalexines et leur intervention dans la résistance hypersensible aux champignons phytopathogènes. *Agronomie*. 9 :529-545.

Sarikurkcü C., Ceylan O., Targan S., Zeljković S. Ć. 2018. Chemical composition and biological activities of the essential oils of two endemic *Nepeta* species. *Industrial Crops and Products*. 125: 5-8.

Sattar A. 1933 . On occurrence, perpetuation and control of gram (*Cicer arietinum* L.) blight caused by *Ascocha rabiei* (pass) with special reference to Indian conditions. *Analysis of Applied biology* .20 :612-632.

Savković ZD., Stupar M C., Grbić MVL., Vukojević JB. 2016. Comparison of anti-*Aspergillus* activity of *Origanum vulgare* L. essential oil and commercial biocide based on silver ions and hydrogen peroxide. *Acta Botanica Croatica*. 75(1):121–128.

Scherrer A. M., Motti R., Weckerle C. S. 2005. Traditional plant use in the areas of monte vesole and ascea, cilento national park (Campania, Southern Italy). *Journal of ethnopharmacology*. 97(1): 129-143.

Sell C. S. 2006. *The chemistry of fragrances: from perfumer to consumer*, Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK. 329 p.

Sharma A., Satyanarayana T. 2013. "Microbial acid-stable  $\alpha$ -amylases: characteristics, genetic engineering and applications." *Process Biochemistry*. 48(2): 201-211.

Shu P., Blackwood A. 1951. STUDIES ON CARBON AND NITROGEN SOURCES FOR THE PRODUCTION OF AMYLOLYTIC ENZYMES BY SUBMERGED CULTURE OF ASPERGILLUS NIGER. *Canadian Journal of Botany*. 29(2): 113-124.

Sikkema J., de Bont J. A., Poolman, B. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of biological Chemistry*. 269(11): 8022-8028.

Silva A., Bacci Jr M., Pagnocca F. C., Bueno O. C., Hebling M. J. A. 2006. Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Microbiological research*. 161(4): 299-303.

Sine J.-P. 2010. *Enzymologie et applications*. Ellipses Edition marketing S.A, Paris.121-238.

Sivachandrakumar N. T. 2016. Evaluation of the relative importance of *Ascochyta pisi* in the *Ascochyta* blight complex of pea in Saskatchewan, University of Saskatchewan.9-14.

Solis-Pereira S., Ernesto V.T., Gustavo V.G., and Mariano G.R.1993. affect of different sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and Solide state fermentations. *Appl.Microbio*.39 :36-411.

Sprague R. 1929. Host range and life-history studies of some leguminous *Ascochytae*. *Phytopathology*. 19(10).

Sprague R., Johnson A. 1950. Ascochyta leaf spots of cereals and grasses in the United States. *Mycologia*. 42(4): 523-553.

Sudo S., Ishikawa T., Sato K., Oba T. 1994. Comparaison of acide stable Alpha-amylases production by *Aspergillus kawachii* in solid-state and submerged cultures, *J. fermentation and bioengineering*. 77(05) :483-489.

Sundarram A., Murthy T. P. K. 2014.  $\alpha$ -amylase production and applications: a review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*. 2(4): 166-175.

Tadja A., Benkada M. Y., 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.

Telli A., Esnault M. A., Khelil A. O. E. H. 2016. An ethnopharmacological survey of plants used in traditional diabetes treatment in south-eastern Algeria (Ouargla province). *Journal of arid environments*. 127, 82-92.

Teibi M. 1992. Contribution à l'étude de l'estimation de biomasse aérienne d'un taillis de chêne vert (*Quercus ilex*) et de deux Genévriers : Genévrier oxycède, Genévrier de Phénicie dans la région de Kasserou. Mémoire d'ingénieur en agroalimentaire, Université de Batna, Algérie, 80p.

Tivoli B. 1988. Guide d'identification des différentes espèces ou variétés de *Fusarium* rencontrées en France sur la pomme de terre et dans son environnement. *Agronomie*. 8(3): 211-222.

Tribst A. A. L., Cristianini M. 2012. High pressure homogenization of a fungi  $\alpha$ -amylase. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 13: 107-111.

Ultee A., Bennik M. H. J., Moezelaar R. J. A. E. M. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*. 68(4): 1561-1568.

Uribe S., Ramirez J., Peña A. 1985. Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *Journal of bacteriology*. 161(3): 1195-1200.

USDA. 2008. Plants profile of *Pisum sativum* L. ( garden pea). United States Department of Agriculture (USDA), Natural Resources Conservation Service (NRCS), Plants database

Vallier P., Bata J., Colobert L. 1977, October. Optimal conditions of alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae* in liquid media. In *Annales de Microbiologie*. Vol. 128.No. 3. pp. 359-371).

Varlet E. 1992. *Découvrez les fruits sauvages*, Edition Ellebore, Paris, 104p

Vierling E. 2008. *Aliments et boissons filières et produits*, n°3, Ed.WKF, Doin ,France , 155p.

Von Höhnel F. 1923. *System der Fungi Imperfecti Fuckel*. Dans R. Falck, *Mycologische Untersuchungen und Berichte*. Verl. Gotthelft, Cassel

Wallen V. 1965. Field evaluation and The importance of the Ascochyta complex on peas. *Can J Plant Sci* 45 :27-33.

Wallen V. 1974. Influence of three Ascochyta diseases of peas on plant development and yield *Can. Plant Dis. Surv* 54: 86-90.

Wu X. Z., CHENG A. X., SUN L. M., LOU H. X. 2008. Effect of plagiochin E, an antifungal macrocyclic bis (bibenzyl), on cell wall chitin synthesis in *Candida albicans* 1. *Acta Pharmacologica Sinica*.29(12): 1478-1485.

Xu F., Gu D., Wang M., Zhu L., Chu T., Cui Y., Tian J., Wang Y., Yang Y. 2017. Screening of the potential  $\alpha$ -amylase inhibitor in essential oil from *Cedrus deodara* cones. *Industrial Crops and Products*.103, 251-256.

Yakoubi M. 2014. Biologie, physiologie et mise en évidence de l'activité enzymatique chez quelques isolats d'*Ascochyta pisi* agent de l'antracnose de petit pois. Mémoire de Magister ,Université d'Oran Es-senia.3-87.

Yang J., Gu D., Wang M., Kou D., Guo H., Tian J., Yang Y. 2018. In silico-assisted identification of  $\alpha$ -amylase inhibitor from the needle oil of *Pinus tabulaeformis* Carr. *Industrial crops and products*, 111, 360-363.

Yu T. 1947. *Ascochyta* blight and leaf and pod spot of Broad Bean in China. *Phytopathology*. 37(4).

Zerrouk M.M. 1994. Etude de quelques aspects biologiques et physiologiques du champignon *ascochyta rabiei* ( pass.) Lab. Agent causal de l'antracnose du pois chiche (*cicer aietinum* L) Mémoire de magister en Microbiologie, Université de Sétif Algérie.26-45.

Znini M., Cristofari G., Majidi L., Mazouz H., Tomi P., Paolini J., Costa J. 2011. Antifungal activity of essential oil from *Asteriscus graveolens* against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Natural product communications*. 6(11): 1934578X1100601147.

Znini M., Cristofari G., Majidi L., Paolini J., Desjobert, J. M., Costa, J. 2013. Essential oil composition and antifungal activity of *Pulicaria mauritanica* Coss., against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *LWT-Food Science and Technology*. 54(2): 564-569.

Zohary D ., Hophf M. 2002. Domestication of plants in the old world: the origin and spread of cultivated plants in west Asia, Europe and the Nile Valley. Third Edition Oxford University Press Inc .New York 328 pages.

Zoubiri L. 2011. Production d'alpha amylase par des moisissures cultivées sur milieu à base de rebuts de dattes. Mémoire de Magister, Université MENTOURI, Constantine, Algérie.3-7.

### Annexe 1: Composition des milieux de culture

Tous les milieux de culture sont stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant 20 minutes sous une pression de 1 bar.

- **Milieu PDA (g/l) : (pomme de terre Dextrose agar).**

Pomme de terre ..... 250 g  
 Dextrose ..... 20 g  
 Agar agar ..... 15 g  
 Eau Distillée q.s.p. .... 1000 ml

- **Milieu Mathur (g/l) :**

Glucose ..... 2,8 g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 2,72 g  
 Peptone ..... 1,00 g  
 MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O ..... 1,23 g  
 Extrait de levure ..... Traces  
 Agar agar ..... 25 g  
 Eau Distillée q.s.p. .... 1000 ml

- **Gélose 2 % :**

Agar agar ..... 2 g  
 Eau Distillée q.s.p. .... 1000 ml

- **Milieu Czapeck glucose à 2% (g/l) :**

Glucose ..... 20 g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 1 g  
 KCl ..... 0,5 g  
 NaNO<sub>3</sub> ..... 2 g  
 MgSO<sub>4</sub> ,7H<sub>2</sub>O ..... 0,5 g  
 FeSO<sub>4</sub> ,7H<sub>2</sub>O ..... 0,01 g  
 Agar agar ..... 20 g  
 Eau Distillée q.s.p. .... 1000 ml

- **Milieu Czapeck amidon à 1% (g/l) :**

Amidon ..... 10 g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 1 g  
 KCl ..... 0,5 g  
 NaNO<sub>3</sub> ..... 2 g

MgSO<sub>4</sub> ,7H<sub>2</sub>O ..... 0,5 g  
FeSO<sub>4</sub> ,7H<sub>2</sub>O ..... 0,01 g  
Agar agar ..... 20 g  
Eau Distillée q.s.p..... 1000 ml

• **Milieu Czapeck amidon à 2% (g/l) :**

Amidon ..... 20 g  
KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> ..... 1 g  
KCl ..... 0,5 g  
NaNO<sub>3</sub> ..... 2 g  
MgSO<sub>4</sub> ,7H<sub>2</sub>O ..... 0,5 g  
FeSO<sub>4</sub> ,7H<sub>2</sub>O .....0,01 g  
Agar agar ..... 20 g  
Eau Distillée q.s.p. ....1000 ml

• **Milieu Czapeck amidon à 2% liquide (g/l) :**

Amidon ..... 20 g  
KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> ..... 1 g  
KCl ..... 0,5 g  
NaNO<sub>3</sub> ..... 2 g  
MgSO<sub>4</sub> ,7H<sub>2</sub>O ..... 0,5 g  
FeSO<sub>4</sub> ,7H<sub>2</sub>O .....0,01 g  
Eau Distillée q.s.p. ....1000 ml

**Annexe 2 : recherche de l'activité amylolytique sur différents milieux .**

<b>Diamètre quotidien (cm) des souches d'<i>Ascochyta pisi</i> sur milieu Czapek +glucose 2% pendant 10 jours d'incubation</b>						
<b>Souche jours</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>	<b>A5</b>	<b>A6</b>
1 <sup>ère</sup> jour	0.60	0.60	0.60	0.60	0,60	0,60
2 <sup>ème</sup> jour	0.62	0.75	1.1	0.77	1,1	0,95
3 <sup>ème</sup> jour	1.45	1,35	1.45	1.35	1,55	1,25
4 <sup>ème</sup> jour	1.55	1,60	1.65	1.50	2,15	1,95
5 <sup>ème</sup> jour	1.75	2,00	2.35	1.70	2,95	2.55
6 <sup>ème</sup> jour	2,30	2,60	2,72	2,20	3,60	3,25
7 <sup>ème</sup> jour	2,20	2,95	3,20	2,25	4,10	3,90
8 <sup>ème</sup> jour	3,25	3,50	3,55	2,95	5,05	4,60
9 <sup>ème</sup> jour	4,05	4,00	4,50	3,85	5,50	5,05
10 <sup>ème</sup> jour	4,40	4,55	4,95	4,30	6,00	5 ,40

Diamètre quotidien (cm) des souches d' <i>Ascochyta pisi</i> sur milieu Czapek + amidon 1 % pendant 10 jours d'incubation						
Souches jours	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1 <sup>ère</sup> jour	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
2 <sup>ème</sup> jour	0,65	0,65	0,85	0,65	1,05	0,95
3 <sup>ème</sup> jour	0,95	1,35	1,40	0,95	1,30	1,55
4 <sup>ème</sup> jour	1,10	1,85	1,85	1,25	2,05	2,05
5 <sup>ème</sup> jour	1,70	2,45	2,70	2,25	2,55	2,95
6 <sup>ème</sup> jour	2,30	3,15	3,20	3,05	3,25	3,70
7 <sup>ème</sup> jour	2,80	3,55	3,50	3,75	4,00	4,40
8 <sup>ème</sup> jour	3,50	4,45	4,40	4,01	4,75	5,35
9 <sup>ème</sup> jour	4,20	5,10	5,10	5,05	5,30	5,90
10 <sup>ème</sup> jour	4,90	5,75	5,75	5,80	5,95	6,65

Diamètre quotidien (cm) des souches d' <i>Ascochyta pisi</i> sur milieu Czapek + amidon 2 % pendant 10 jours d'incubation						
Souches jours	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1 <sup>ère</sup> jour	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
2 <sup>ème</sup> jour	0,95	0,62	1,00	0,75	1,05	0,95
3 <sup>ème</sup> jour	1,35	1,05	1,45	1,00	1,40	1,30
4 <sup>ème</sup> jour	1,55	1,45	1,65	1,35	2,00	1,90
5 <sup>ème</sup> jour	2,05	2,10	2,60	2,15	2,85	2,65
6 <sup>ème</sup> jour	2,40	2,65	3,20	2,35	3,50	3,50
7 <sup>ème</sup> jour	3,10	3,60	3,85	3,10	4,00	3,95
8 <sup>ème</sup> jour	3,70	4,00	4,35	3,20	4,75	5,00
9 <sup>ème</sup> jour	4,20	5,05	5,10	4,45	5,50	5,75
10 <sup>ème</sup> jour	4,85	5,35	5,60	4,85	6,00	6,30

### Annexe 3 : Effet de variation du pH sur la croissance mycélienne et l'activité amylolytique

Diamètre quotidien (cm) de souches <b>A1</b> sur milieu Czapek + amidon 2 % avec différente PH			
Milieux	Cz + amidon 2% PH4	Cz + amidon 2% PH6	Cz + amidon 2% PH8
jours			
<b>J3</b>	1,55	1,9	1,65
<b>J4</b>	2,25	3,2	2,65
<b>J5</b>	3,3	3,5	3,3
<b>J6</b>	3,65	4,3	3,85
<b>J7</b>	3,95	4,45	4,35
<b>J8</b>	4,1	4,65	4,55
<b>J9</b>	4,3	5,1	4,75
<b>J10</b>	4,55	5,4	5,05

Diamètre quotidien (cm) de souches <b>A2</b> sur milieu Czapek +amidon 2 % avec différente PH			
Milieux jours	Cz +amidon 2% PH4	Cz +amidon 2% PH6	Cz +amidon 2% PH8
J3	1,45	1,9	1,7
J4	2,35	2,6	2,35
J5	3,15	3,25	2,85
J6	3,65	3,8	3,85
J7	3,95	4,3	4,05
J8	4,2	4,65	4,25
J9	4,65	4,9	4,45
J10	5	5,25	5,1

Diamètre quotidien (cm) de souches <b>A3</b> sur milieu Czapek +amidon 2 % avec différente PH			
Milieux jours	Cz +amidon 2% PH4	Cz +amidon 2% PH6	Cz +amidon 2% PH8
J3	2,4	2,4	2,25
J4	2,55	2,8	2,75
J5	3,25	3,8	3,55
J6	3,55	4,15	3,65
J7	4,05	4,45	4,15
J8	4,2	4,6	4,35
J9	4,4	4,75	4,55
J10	5,05	5,25	5,15

Milieux jours	PH4	PH6	PH8
J3	1,75	1,75	1,7
J4	2,55	2,5	2,4
J5	3,2	3,1	2,95
J6	3,65	3,7	3,65

Diamètre quotidien (cm) de souches A6 sur milieu Czapek +amidon 2 % avec différente PH			
Milieux	Cz +amidon 2% PH4	Cz +amidon 2% PH6	Cz +amidon 2% PH8
jours			
J3	1,75	2,25	2,15
J4	2,4	3,25	3,15
J5	3,2	4,1	3,6
J6	3,45	4,85	4,55
J7	3,55	5,05	4,85
J8	3,75	5,25	5,05
J9	4,05	5,45	5,15
J10	4,25	6	5,65

#### Annexe 4: Mise en évidence de l'activité amylolytique par la méthode cup plate

Diamètre en (cm) des zones de lyse des filtrats de culture de milieu Czapeck +amidon 2% à PH 6				
	Témoin	Puit 1	Puit 2	Puit 3
A2	0,2	1,15	0,85	1,55
A3	0,1	1,35	1,45	1,15
A4	0	0,95	1,1	1
A5	0,1	1,5	1,45	1,75
A6	0,05	1,85	2,15	1,75

## Annexe 5: Cinétique de la croissance

Cinétique de la souche A2							
Concentration	Témoin	41,5 µL/mL		42,5 µL/mL		43 µL/mL	
jours							
<b>J3</b>	0,7	0	0	0	0	0	0
<b>J4</b>	0,9	0,15	0	0	0	0	0
<b>J5</b>	1,3	0,35	0	0	0	0	0
<b>J6</b>	1,45	0,5	0	0,12	0	0	0
<b>J7</b>	1,5	0,75	0,05	0,23	0	0	0
<b>J8</b>	1,9	0,83	0,1	0,27	0,05	0	0
<b>J9</b>	2,5	0,9	0,1	0,35	0,1	0	0
<b>J10</b>	3,1	0,9	0,1	0,45	0,1	0	0
<b>Zone de lyse</b>	3,7	0,9	0,1	0,45	0,1	0	0

Cinétique de la souche A3							
Concentration	Témoin	41,5 µL/mL		42,5 µL/mL		43 µL/mL	
jours							
<b>J3</b>	0,6	0	0	0	0	0	0
<b>J4</b>	0,9	0,3	0,3	0	0	0	0
<b>J5</b>	1,75	0,7	0,6	0,6	0,8	0	0
<b>J6</b>	2,1	0,85	0,7	0,72	0,95	0	0
<b>J7</b>	3,2	1,05	0,95	0,8	1,05	0	0
<b>J8</b>	3,4	1,18	1,05	0,95	1,15	0	0
<b>J9</b>	4	1,25	1,15	1,25	1,25	0	0
<b>J10</b>	4,4	1,3	1,15	1,25	1,25	0	0
<b>Zone de lyse</b>	4,8	1,3	1,15	1,25	1,25	0	0

<b>Taux de inhibition %</b>			
<b>Concentration</b>	41,5 µL/mL	42,5 µL/mL	43 µL/mL
<b>Souches</b>			
<b>A2</b>	83,87	91,12	100
<b>A3</b>	70,15	71,59	100
<b>A4</b>	86,59	88,65	100
<b>A6</b>	87,5	89,88	100