

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE BLIDA 1
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES BIOTECHNOLOGIES

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master 2

Option : Biologie des Interactions Plantes-Microorganismes

Thème

Etude de l'interaction

Pisum spp. –Fusarium oxysporum f.sp. pisi

Présenté par

ABDELMOUMENE Wissem

GOUDJIL Sarah

Soutenu devant le jury :

BOUCHENAK F.	M.A.A	U.BLIDA 1	Présidente
BENCHABANE M.	Professeur	U.BLIDA 1	Promoteur
MEKHALDI D.	Doctorante	U.BLIDA 1	Co-promotrice
BENOUSSAID N.	M.A.A	U.BLIDA 1	Examinatrice
YALA A.	Doctorante	U.BLIDA 1	Invitée

ANNEE UNIVERSITAIRE 2015/2016

Remerciements

« Après avoir remercié Dieu le tout puissant »

Nous tenons à remercier tous ceux qui, d'une façon ou d'une autre, nous ont aidé durant notre travail de mémoire. Certains par leurs conseils et leurs connaissances scientifiques et d'autres par leur soutien et leur présence dans les moments les plus pénibles.

Nous tenons à exprimer, en premier lieu, nos plus vifs remerciements à nos encadreurs **Pr. BENCHABANE M.** et **M^{lle} MEKHALDI D.** qui ont dirigé ce travail, ça ne sera pas suffisant pour leurs exprimer toute notre reconnaissance pour la confiance, la disponibilité et la générosité qu'ils nous ont accordé pour faire avancer ce travail.

Nous tenons à remercier **M^{me}. BOUCHENAK F.** de nous avoir honoré en acceptant d'être présidente de jury. Nous exprimons nos vifs remerciements à **M^{me} BENOUSSAID N.** et **M^{lle} Yala A.** de m'avoir accordé leurs temps pour examiner et enrichir ce travail.

Nos remerciements vont également au personnel du laboratoire de Mycologie, en particulier à **FADIL Djamila**, ingénieur du laboratoire, pour sa disponibilité et ses encouragements durant toute l'expérimentation.

Enfin que toutes les personnes, qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

A mes très chers et supers parents, source de mon bonheur,

Ma mère et Mon père

En témoignage de ma reconnaissance, envers le soutien, les sacrifices et tous les efforts qu'ils ont fait pour mon éducation ainsi que ma formation, qui m'ont toujours aidé et guidé vers le chemin de la réussite.

A mes chers frères :

- Amar

- Mohamed

- Abderrahmane

Je vous souhaite une vie pleine de bonheurs et de réussite.

*A la personne qui m'aide et me supporte depuis longtemps **Hamza**, merci aussi pour le PC.*

*A ma chère **Wissem** avec qui j'ai passé de très beaux moments durant toute l'année.*

Je dédie ce travail

SARAH

Dédicaces

Je Dédie ce mémoire

A Ma Chère Grand-Mère

A Mon Extraordinaire Mère

A Mon Exceptionnel Père,

Nullé dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, ma reconnaissance et mon profond attachement. Pour tout l'amour que vous m'avez donné Pour tous les sacrifices que vous avez consentis pour nous, Je vous dédie ce mémoire en témoignage de mon amour éternel et ma gratitude infinie. Que Dieu vous prête une bonne santé et une longue vie.

*A mes chers frères **Ibrahim**, qui possède le plus grand cœur, Un très grand merci pour tous, et surtout pour le PC, **Ismail** et **Oussama**, à qui je souhaite tout le bonheur.*

*A l'exceptionnel, à **Kheir-Eddine** et toute sa Famille qui m'ont toujours soutenu.*

*A ma chère collègue et binôme **Sarah** avec qui j'ai partagé le bon et le mauvais durant toute l'année.*

WISSEM

Résumé

Etude de l'interaction *Pisum* spp.-*Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*

Notre travail porte sur l'étude de l'interaction *Pisum* spp.-*Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (*Fop*). La première partie du travail consiste à l'étude de comportement de 18 génotypes du pois vis-à-vis de deux souche de *Fop* : R1 (race 1) et R2F42 (race 2). L'expérimentation a été menée sous serre dans des conditions semi-contrôlées. Les génotypes ont été inoculés selon la méthode d'immersion des racines dans les suspensions de spores. Les 2 souches ont pu induire des symptômes typiques de la fusariose vasculaire sur les plants inoculés (flétrissement, jaunissement, dessèchement et/ou mort de la plante). Le taux d'infection est le paramètre d'évaluation de la maladie. Les deux génotypes P648 et Merveille de Kelvedon sont résistants à la souche R1 en enregistrant des valeurs ne dépassant pas 50%. Les génotypes 2946, P21, 3030, 2998, 3106 et 26 ont été les plus sensibles à R1 avec des taux d'infection qui dépassent 70%. La plupart des génotypes étudiés étaient sensibles à souche R2F42 en enregistrant des taux d'infection de 100%. Le génotype 3044 a été partiellement résistant à R2F42 (50,92%). Le génotype contrôle Merveille de Kelvedon a été le plus résistant à R2F42 (21,42%). La souche R2F42 a été plus virulente que la souche R1, en enregistrant les valeurs de taux d'infection les plus élevés.

Pour déterminer la continuité de la sève, nous avons utilisé le bleu de naphthol comme traceur colorant. Les génotypes résistants ont présenté une coloration bleue au niveau des racines, des tiges et des tissus des feuilles, alors que cette coloration a été limitée aux racines chez les génotypes sensibles.

Afin de détecter la présence de *Fop* au niveau des tissus végétaux, un essai de ré-isolément du pathogène a été effectué à partir des différentes parties des plantes inoculées (racine, collet, partie inférieure et partie supérieur de la tige). Les génotypes sensibles P615 et 2946 montrent le développement des colonies de *Fop* autour des fragments de toutes les parties. En revanche, l'apparition des colonies du champignon a été limitée aux racines et au collet chez les génotypes résistants.

Mots clés : *Pisum* spp., fusariose vasculaire, *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*, résistance.

Abstract

Study of the interaction *Pisum* spp. - *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*

Our work concerns the study of the interaction *Pisum sativum*-*Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (*Fop*). The first part of the work involves the study of behavior of 18 genotypes of pea toward two strains of *Fop*: R1 (race 1) and R2F42 (race 2). The experiment was carried under greenhouse under semi-controlled conditions. The genotypes were inoculated according to the method of immersion of the roots in the suspensions of spores. The 2 strains could induce typical symptoms of the fusarium wilt on the inoculated seedlings (wilting, yellowing, drying and/or died of the plant). The rate of infection is the parameter used to evaluate the disease. Both genotypes P648 and Kelvedon Wonder are resistant to R1 strain by recording values not exceeding 50%. The genotypes 2946, P21, 3030, 2998, 3106 and 26 were the most sensitive to R1 with rates of infection exceeding 70%. Most of the genotypes studied were susceptible to strain R2F42 by recording rates of infection 100%. The genotype 3044 was partially resistant to R2F42 (50,92%). The genotype control Kelvedon Wonder was the most resistant to R2F42 (21.42%). The strain R2F42 was more virulent than the strain R1, by recording the highest values of rates of infection.

To determine the continuity of the sap, we used naphthol blue as dye tracer. Resistant genotypes showed a blue coloration in the roots, stems and leaf tissues, while this coloring has been limited to roots in susceptible genotypes.

To detect the presence of *Fop* in plant tissues, a pathogen re-isolation test was carried out from different parts of plants inoculated (root, crown, lower and upper part of the stem). The susceptible genotypes P615 and 2946 amounted colony development of *Fop* around fragments of all parties. However, the appearance of the fungus colonies was limited to the roots and the crown in resistant genotypes.

Keywords: *Pisum* spp., fusarium wilt, *Fusarium oxysporum* f .sp. *pisi*, resistance.

ملخص

دراسة التفاعل *Pisum spp.-Fusarium oxysporum f. sp. pisi*

يهدف عملنا إلى دراسة التفاعل *Pisum spp.-Fusarium oxysporum f. sp. pisi* (*Fop*). ارتكز الجزء الأول من العمل على دراسة سلوك 18 نمط بازلأء تجاه سلالتين لـ *Fop* (R1 و R2F42). أجريت التجربة في بيت بلاستيكي في ظروف شبه مراقبة. طعمت الأنماط حسب طريقة غمس الجذور في المعلق الفطري. استطاعت السلالتان أن تسبب ظهور أعراض الذبول الفوزاري على النباتات المطعمة (ذبول، إصفرار، جفاف وموت النبتة). نسبة الإصابة هو المقياس المستعمل لتقييم المرض. النمطان P648 و Merveille de Kelvedon كانا مقاومين للسلالة R1 مسجلين فيما لا تتعدى 50%. الأنماط 2946، 3030، 2998، 3106 و 26 كانوا حساسين لـ R1 مع نسب إصابة تتعدى 70%. أغلبية الأنماط المدروسة كانت حساسة للسلالة R2F42 مسجلين نسبة إصابة 100%. النمط 3044 كان مقاوم جزئياً لـ R2F42 (50,92%). نمط المراقبة Merveille de Kelvedon كان الأكثر مقاومة (21,42%). السلالة R2F42 كانت الأكثر شراسة مقارنة بالسلالة R1، مسجلة لأعلى نسب إصابة.

لتحديد استمرار مرور النسغ، استعملنا الحبر الصيني كملون و محدد. أظهرت الأنماط المقاومة تلون أزرق على مستوى الجذور، السيقان و الأنسجة الورقية، بينما كان هذا التلون محدوداً في الجذور لدى الأنماط الحساسة.

من أجل اكتشاف وجود *Fop* في الأنسجة النباتية، أجري اختبار إعادة عزل الفطر من أجزاء مختلفة لنباتات بازلأء مطعمة (جذر، طوق، جزء سفلي و جزء علوي للساق). بين النمطان الحساسان P615 و 2946 ظهور مستعمرة لـ *Fop* حول قطع مختلف الأجزاء. في حين أن ظهور مستعمرات الفطر كان محدوداً في الجذور و الطوق لدى الأنماط المقاومة.

الكلمات المفتاحية: *Pisum spp.*، الذبول الفوزاري، *Fusarium oxysporum f. sp. pisi*، مقاومة.

Sommaire

Introduction

Chapitre I. Synthèse bibliographique	3
1. Le pois (<i>Pisum spp.</i>)	3
1.1. Origine et historique	5
1.2. Description botanique	5
1.3. Taxonomie	5
1.4. Principaux types de culture et intérêt agro-alimentaire	7
1.5. Production du pois	7
1.5.1. Production mondiale	7
1.5.2. Production en Algérie	8
1.6. Ecologie	8
1.6.1. Exigences climatiques	8
1.6.2. Sol et besoins en eau et en lumière	8
1.7. Stress biotiques et abiotiques limitant la production	8
1.7.1. Stress abiotiques	8
1.7.2. Stress biotiques	9
1.7.2.1. Ravageurs et parasites	9
1.7.2.2. Principales maladies bactériennes et virales	9
1.7.2.3. Principales maladies fongiques.....	10
2. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i> (<i>Fop</i>).....	11
2.1. Généralité	11
2.2. Taxonomie et caractères morphologiques	12
2.3. Les races de <i>Fop</i>	13

3. La fusariose vasculaire du pois	14
3.1. Historique de la maladie	14
3.2. Cycle d'infection	14
3.3. Transmission	16
3.4. Mécanismes parasitaires	16
3.4.1. Les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire	16
3.4.2. Production de toxines	16
3.4.3. Autres mécanismes	17
3.5. Mécanismes de défense de la plante	17
3.6. Symptômes et conditions favorables	19
3.7. Contrôle de la maladie	21
3.7.1. Lutte culturale	21
3.7.2. Lutte chimique	21
3.7.3. Lutte biologique	21
3.7.4. Lutte génétique	22
Chapitre II. Matériel et méthodes	23
1. Etude de comportement des génotypes de pois vis-à-vis de la fusariose vasculaire	23
1.1. Matériel végétal	23
1.2. Souches de <i>Fop</i>	25
1.3. Prégermination des graines	25
1.4. Préparation de l'inoculum	26
1.5. Inoculation des plantules	27
1.6. Traitements appliqués	28
1.7. Evaluation de la maladie	29
1.7.1. Suivi symptomatologique	29

1.7.2. Calcul du taux d'infection	30
2. Traçage de la continuité de la sève	30
3. Essai de détection de la présence de <i>Fop</i>	31
3.1. Matériel végétal	31
3.2. Ré-isolément de <i>Fop</i>	31
Chapitre III. Résultats et discussion	32
1. Comportement des géotypes du pois vis-à-vis de la fusariose vasculaire.....	32
1.1. Description symptomatologique	32
1.1.1. Symptômes sur la partie aérienne	32
1.1.2. Symptômes racinaires	34
1.1.3. Symptômes internes	34
1.2. Taux d'infection	35
2. Traçage de la continuité de la sève	38
3. Détection de la présence de <i>Fop</i>	40
4. Discussion Générale.....	41

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

CWDEs	<i>Cell Wall Degrading Enzymes</i>
EDS	Eau Distillée Stérile
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
Fop	<i>Fusarium oxysporum f.sp. pisi</i>
G	Grossissement
IAS	<i>Institute of Sustainable Agriculture (Cordoba, Spain)</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
min	Minute
ml	Millilitre
PDB	Potato Dextrose Broth (milieu de culture)
pH	Potentiel hydrogène
rpm	Rotation par minute
spp.	Espèces
ssp.	Sous espèce
°C	Degré Celsius

Liste des tableaux et figures

Tableau 1. Les différents traitements appliqués	28
Figure 1. Morphologie générale du pois	4
Figure 2. Taux de croissance annuel du pois frais en Algérie 1993 - 2014	7
Figure 3. Caractères microscopiques de <i>Fusarium oxysporum</i>	13
Figure 4. Cycle infectieux de <i>Fusarium oxysporum</i>	15
Figure 5. Symptômes de la fusariose vasculaire sur pois.....	20
Figure 6. Semences des génotypes de pois étudiés	23
Figure 7. Cultures des deux souches de <i>Fop</i> utilisées	24
Figure 8. Désinfection et pré germination des graines	25
Figure 9. Préparation de l'inoculum	26
Figure 10. Inoculation des plantes du pois	27
Figure 11. Essai de continuité de flux de la sève sur des plantes du pois.....	30
Figure 12. Etapes conçues pour la désinfection superficielle et de ré-isolement de <i>Fop</i>	31
Figure 13. Progression des symptômes de la fusariose vasculaires chez le génotype 3106 inoculé avec la souche R1 de <i>Fop</i>	32
Figure 14. Progression des symptômes de la fusariose vasculaires chez le génotype 3044 inoculé avec la souche R2F42 de <i>Fop</i>	33
Figure 15. Evolution des symptômes de la fusariose vasculaires sur les feuilles .	34
Figure 16. Aspect des racines des plantes 30 jours après l'inoculation.....	35
Figure 17. Symptômes internes dus aux deux souches de <i>Fop</i> (R1 et R2F42) 30 jours après l'inoculation (G : ×8).....	36
Figure 18. Taux d'infection des 18 génotypes étudiés 30 jours après l'inoculation avec les deux souches de <i>Fop</i> (R1 et R2F42)	37

Figure 19. Evolution des valeurs de taux d'infection chez quelques géotypes étudiés.....	38
Figure 20. Valeurs minimales et maximales de taux d'infection de deux souches R1 et R2F42 de <i>Fop</i>	39
Figure 21. Coloration par le bleu de naphtol au niveau des feuilles du géotype Merveille de Kelvedon inoculé avec la souche R2F42 (G : ×10)	40
Figure 22. Coloration par le bleu de naphtol au niveau des tiges et des racines..	41
Figure 23. Développement des colonies de <i>Fop</i> autour de la section des plantes inoculées	42

Introduction

Les légumineuses alimentaires sont considérées parmi les cultures importantes dans le monde et dans la plupart des pays du bassin méditerranéen. Elles offrent un apport en protéines végétales pour l'alimentation humaine et animale et constituent un excellent précédent cultural dans les systèmes de production céréalière (FAOSTAT, 2013).

Le pois (*Pisum* spp.) est une légumineuse annuelle cultivée dans le monde entier. Selon les statistiques de la FAO, et à partir de l'année 2000, la production mondiale s'est stabilisée autour de 10 million de tonnes. Les principaux pays producteurs sont le Canada (35%), la Russie (12%), et la Chine (13%). En Algérie, les conditions climatiques et le sol sont très favorables à sa culture, dont la culture du pois frais s'étendait sur 50 315 hectares avec une production de 186 300 tonnes (FAOSTAT, 2013).

La production et la croissance du pois sont souvent limitées par de nombreux stress biotiques et abiotiques (Miguel *et al.*, 2006). Le froid, la sécheresse et les déficits nutritionnels sont les stress environnementaux les plus importants pouvant affecter le pois (Cousin, 1997). Cette culture peut subir des ravages par une large gamme d'agents pathogènes comprenant des champignon, des bactérie, des virus, des insectes et des nématodes (Rubiales *et al.*, 2012).

Fusarium oxysporum f. sp. *pisi* (*Fop*) est l'agent responsable de la fusariose vasculaire, une maladie destructrice du pois qui a été rapportée dans tous les pays où le pois est cultivé (Kraft et Pflieger, 2001). Ce pathogène tellurique peut survivre sous forme de chlamydospores à paroi épaisse, qui restent viables dans le sol pendant plus de 10 ans (Kraft, 1994). A l'origine, quatre races spécifiques de *Fop* ont été identifiées : la race 1, la race 2, la race 5 et la race 6 (Kraft, 1994). La maladie est caractérisée par un ensemble de symptômes incluant

l'éclaircissement des nervures, l'enroulement des feuilles, le flétrissement, le jaunissement, les nécroses puis la mort de la plante (MacHardy et Beckman, 1983). De plus, la race 2 du pathogène cause des décolorations des tissus vasculaires (Kraft et Pflieger, 2001).

Le contrôle de cette maladie se fonde principalement sur l'intégration des différentes méthodes de gestion, y compris les pratiques culturales, la désinfection des sols, le biocontrôle et l'amélioration de la résistance des génotypes cultivés (Navas-Cortes *et al.*, 1998 ; Alabouvette, 2009 ; Momma *et al.*, 2010, Sharma *et al.*, 2010, Bani *et al.*, 2012), bien que la stratégie de gestion la plus appropriée et la plus efficace est l'utilisation de cultivars résistants (Haglund et Kraft, 2001).

Notre travail a pour objectif d'étudier l'interaction *Pisum* spp.-*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. Pour cela, trois essais sont réalisés :

1. Etude du comportement de génotypes de *Pisum* spp. vis-à-vis de souches pathogènes de *Fop*. L'expérimentation a été menée sous serre dans des conditions semi-contrôlées.
2. Essai du traçage de la continuité de la sève.
3. Essai de détection de la présence de *Fop* afin d'étudier l'ampleur de la colonisation par l'agent pathogène.

Chapitre I.

Synthèse bibliographique

1. Le pois (*Pisum* spp.)

1.1. Origine et historique

Le pois est une plante très anciennement cultivée dans le monde puisque sa culture a commencé il y a environ 8 000 ans dans la région du Croissant fertile, au même temps que certaines céréales (blé, orge) et d'autres légumineuses (vesce, lentille). Il a été découvert dans des sites archéologiques néolithiques en Grèce et en Irak entre 7 500 et 5 000 ans avant Jésus-Christ, sous forme de restes provenant soit de plantes de cueillette, soit de plantes domestiquées. Par la suite, sa culture s'est diffusée vers l'ouest (Europe) et vers l'est (Inde). On en trouve trace notamment dans le site archéologique de Troie, en Europe centrale (vers 4 000 ans avant Jésus-Christ), en Europe occidentale et en Inde (vers 2 000 ans avant Jésus-Christ) (Cousin et Bannerot, 1992). Des restes du pois ont été retrouvés notamment dans des habitats lacustres du début de l'âge du bronze en Suisse et en France (lac du Bourget) (Pitrat et Foury, 2003).

Les centres primaires d'origine du pois se situent probablement en Abyssinie, en Afghanistan et aux régions avoisinantes. La région méditerranéenne constituant un centre secondaire. A partir de ces centres, le pois se serait dispersé dans le reste de l'Europe et de l'Asie (Cousin, 1996).

1.2. Description botanique

Les pois sont des plantes annuelles essentiellement autogames, mais des taux d'allogamie peuvent être observés chez certains cultivars (Pouvreau, 2004).

Le pois est une plante herbacée de 20 à 150 cm de hauteur (Nyabyenda, 2005). Il forme une racine principale pivotante développée et des racines secondaires latérales. Le système racinaire ramifié peut atteindre 1 m. Des nodules globulaires peuvent se développer sur la racine principale des jeunes plants dans les 30 premiers cm (Figure 1) (Pierre, 1994).

Le pois est caractérisé par une tige herbacée angulaire ou cylindrique avec peu ou pas de ramification. Le plant est plus ou moins grimpant suivant les cultivars. La tige est constituée de plusieurs entre-nœuds creux, souvent pourpres à la bas et avec des stipules larges. Il forme des feuilles alternantes avec 1 à 3 paires de folioles et un long pétiole creux. Les folioles opposées ou non sont rhomboïdes, asymétriques et pourvues de courts pétioles (Pierre, 1994).

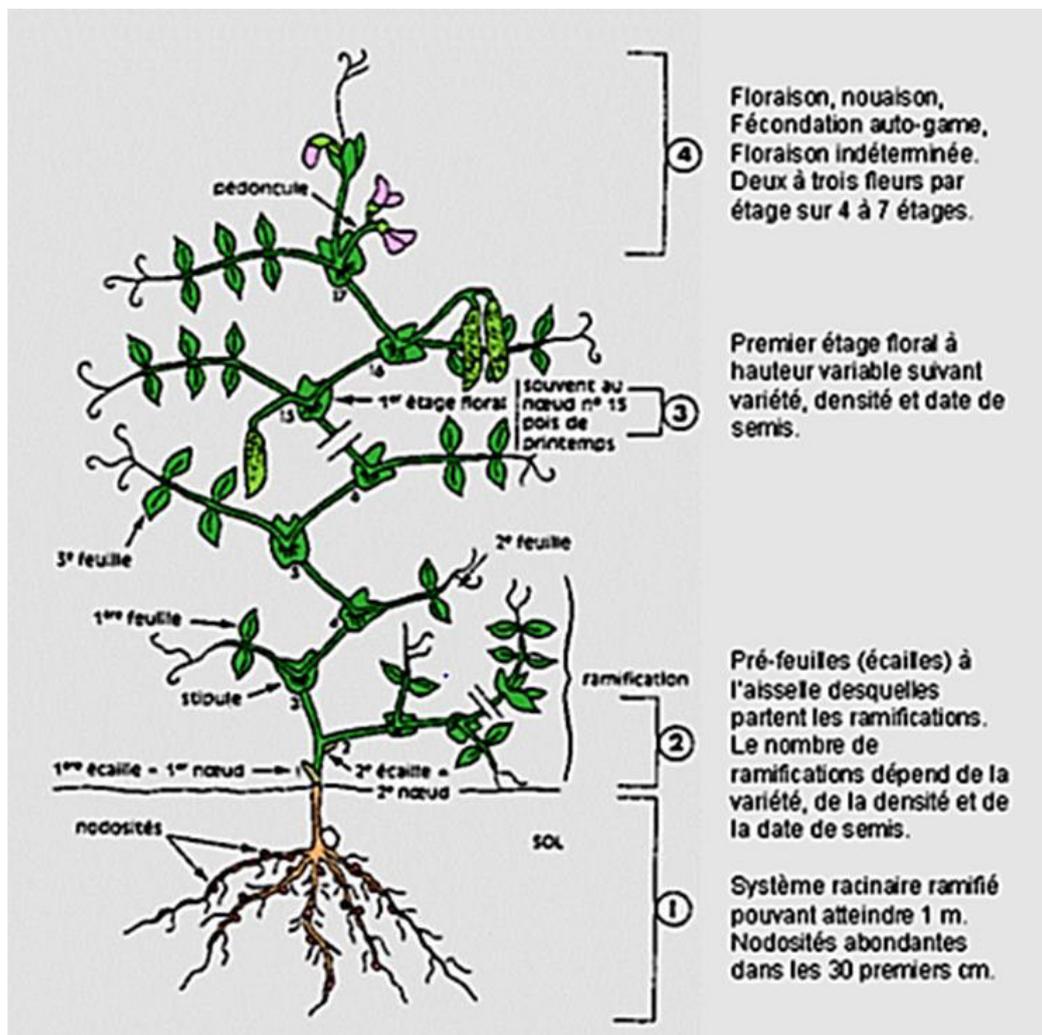


Figure 1. Morphologie générale du pois (Boyeldieu, 1991).

Les fleurs du pois sont blanches ou violettes. Leur taille est de 3 à 4 cm de long. Elles naissent à l'aisselle des feuilles et les pédoncules de longueur variable supportent une à trois fleurs (Elzebroek et Wind, 2008). Les feuilles sont alternes, composées-pennées, et se composent de deux grandes stipules foliacées, un à plusieurs paires de folioles ovales et des vrilles terminaux (McGee, 2012).

Le fruit est une gousse à deux valves et d'une longueur de 4,5 à 8 cm. Les gousses contiennent en moyenne 2 à 5 graines. Les graines sont de couleur verte, crème, brune, orange brun ou violette. Les graines de couleur verte, jaune ou brune, sont souvent tachetées de couleur violette. Elles sont globulaires, lisses ou ridées et pourvues d'un petit hile elliptique qui contient des cotylédons jaunes (Pierre, 1994).

1.3. Taxonomie

Pisum fait partie de la famille des *Fabaceae*, de la sous-famille des *Papilionaceae* et de la tribu des *Vicieae*. Une grande diversité morphologique a été observée entre les plantes sauvages du pois. De nombreuses espèces de pois furent donc initialement décrites par les botanistes pour différencier ces plantes suivant leurs caractéristiques morphologiques comme par exemple *Pisum formosum*, *P. transcausicum*, *P. abyssinicum*, *P. aethiopicum*, *P. arvense* et *P. sativum* qui est l'espèce la plus répandue (Fourmont, 1956).

La classification des *Pisum* basée sur la morphologie et la caryologie a changé au fil du temps d'un genre avec cinq espèces (Govorov, 1937) à un genre monotypique (Lamprecht, 1966 ; Marx, 1977). Bien que Davis (1970) a reconnu deux espèces, *P. fulvum* et *P. sativum*, à la fois originaire de Turquie, il n'a pas tenu en compte la troisième espèce putative *P. abyssinicum*, qui est endémique au Yémen et en Ethiopie (Smykal *et al.*, 2011). La classification la plus récente et la plus utilisée de Maxted et Ambrose (2000) a adopté trois espèces : *P. abyssinicum*, *P. fulvum* et *P. sativum*.

1.4. Principaux types de culture et intérêt agro-alimentaire

Plus de 1000 variétés de pois ont été recensées dans le monde entier (Cousin, 1997). Les graines de pois sont riches en protéine (23-25%), en amidon (50%), en sucres solubles (5%), en fibre, en minéraux et en vitamines (Bastianelli *et al.*,

1998). Le pois, comme d'autres légumineuses, accumule également des substances naturelles (métabolites secondaires), comme les isoflavonoïdes qui sont considérés bénéfiques à la santé humaine grâce à leur pouvoir anticancéreux et d'autres activités promotrices de la santé (Dixon et Sumner, 2003). Pour ces raisons, le pois possède plusieurs usages finaux dont les feuilles, les gousses vertes, la graine non mûre (verte) et la graine mûre sèche peuvent être utilisées comme nourriture humaine ou alimentation animale (Brink et Belay, 2006).

Le pois potager ou petit pois (*Pisum sativum*) est une plante annuelle cultivée pour ses graines. Il est caractérisé par sa hauteur variable selon les variétés (de 0,40 à 0,60 m pour les variétés naines et demi-naines, et jusqu'à 1,50 m pour les variétés à rames, très productives et doivent-être tuteurées), par des tiges grêles, des feuilles terminées par une ou plusieurs vrilles et composées d'une ou trois paires de folioles, et les gousses sont de 5 à 10 cm de longueur, peuvent contenir jusqu'à une dizaine de graines lisses globulaires ou angulaires (Jean, 1994).

Le pois de conserve comprennent des variétés cultivées en plein champ, à forte densité, sans tuteur, récoltées mécaniquement et doivent produire des petits pois frais de bonne qualité. Les variétés à graines lisses sont en général appertisées, tandis que les variétés à graines ridées sont traitées en surgélation et donnent un produit plus sucré et moins farineux. Mais, de plus en plus, des variétés à graines ridées petites sont transformées par appertisation (Cousin, 1996).

Les pois protéagineux sont des variétés sélectionnées pour une production élevée de pois secs relativement riches en protéines, pour l'alimentation animale. Ils ont un cycle végétatif plus court et sont considérés comme culture entièrement mécanique (Jean, 1994).

Le pois fourrager comprend des variétés appartenant à la sous espèce *arvense* de *P. sativum*. Les tiges sont très longues, peuvent atteindre 2 m et portent de nombreuses ramifications. Les fleurs sont en général colorées en rose violacé et les gousses sont petites et ne renferment que quelques graines. Ces variétés produisent une quantité élevée de matière verte mais très peu de graines. Elles sont cultivées seules ou en association avec une céréale pour une production importante de fourrage vert (Cousin, 1996).

Comme d'autres légumineuses, le pois est recommandé dans la rotation des cultures, car il brise le cycle des maladies et ravageurs, il fournit de l'azote, il améliore la diversité et l'activité microbienne du sol, il améliore l'agrégation du sol et il conserve l'eau (Biederbeck *et al.*, 2005).

1.5. Production du pois

1.5.1. Production mondiale

Le pois est la deuxième culture importante de légumineuses dans le monde entier avec un rendement moyen de 1.72 tonnes/ha. Les pois secs sont cultivés commercialement dans presque 100 pays, mais la production se concentre au Canada (35%), en Russie (12%), et en Chine (13%). Conjointement, ces trois pays produisent plus de la moitié des pois secs du monde (FAOSTAT, 2013).

1.5.2. Production en Algérie

En Algérie, le pois a été cultivé avant 1830 dans les jardins et les champs en Kabylie (Laumont et Chevassus, 1960). La culture a pris un développement important en 1945. Elle a connue par la suite un essor remarquable de 1947 à 1952. En 1980, 10 800 ha ont été consacrés à cette culture. C'est en 1993 (Figure 2) qu'on a enregistré la superficie la plus importante avec 20 800 ha alors que le rendement le plus important a été enregistré en 2001 sur une superficie de 19 970 ha (FAOSTAT, 2004). En 2009, cette superficie passe à 28 724 ha avec une production annuelle de 102 970 tonnes, soit un rendement de 35 800 kg/ha (MADR, 2009). En 2013, la culture du petit pois frais s'étendait sur 50 315 hectares avec une production de 186 300 tonnes, dont les wilayas productrices sont Mascara, Boumerdes, Biskra et Tlemcen (Benachour, 2008 ; FAOSTAT, 2013).

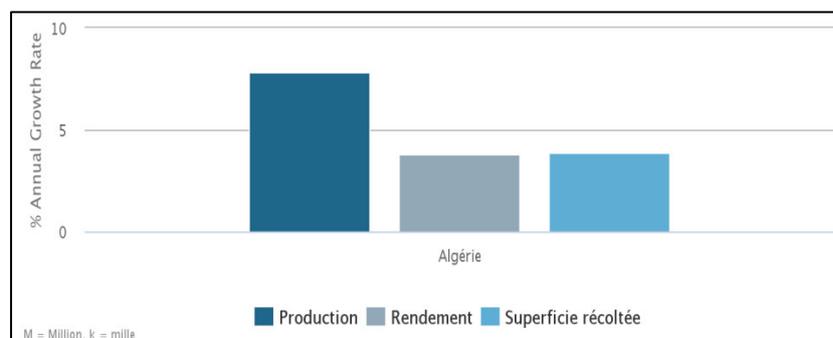


Figure 2. Taux de croissance annuel du pois frais en Algérie 1993 – 2014 (FAOSTAT, 2013).

1.6. Ecologie

1.6.1. Exigences climatiques

Le pois demande un climat tempéré humide. Les variétés d'hiver résistent au froid (-1 à 2°C). Les températures élevées accélèrent la maturation des petits pois et entraînent leur durcissement. Au cours de végétation, il demande des températures relativement peu élevées. Le meilleur taux de germination est en général obtenu à une température de 18°C. En général, les pois s'adaptent au climat frais et supportent le froid rigoureux (Jean, 1994).

1.6.2. Sol et besoins en eau et en lumière

Le pois s'accommode de tous les types de sol à condition qu'ils soient bien drainés et qu'ils offrent une bonne capacité de rétention en eau. Le pH optimal se situe entre 5,5 et 7,0 (Jean, 1994).

En outre, le pois est susceptible à la sécheresse. A certaines périodes sèches, il est nécessaire de prévoir des irrigations. Il a besoin d'eau au moment de la floraison et de la formation des graines. Le pois demande de l'air et de la lumière, donc il ne doit pas être cultivé dans des parcelles abritées (Jean, 1994).

1.7. Stress biotiques et abiotiques limitant la production

La production de légumineuses est grandement limitée par de nombreux stress biotiques et abiotiques. Un grand nombre de maladies, ravageurs et stress abiotiques sont communs à toutes les cultures de légumineuses (Miguel *et al.*, 2006).

1.7.1. Stress abiotiques

Le froid, la sécheresse et les déficits nutritionnels sont les stress environnementaux les plus importants pouvant affecter la production du pois. La plupart des cultivars de pois sont très susceptibles au froid et particulièrement les lignées caractérisées par des entre-nœuds longs, d'une grande surface foliaire et des graines ridées (Cousin, 1997). La sécheresse et le deuxième stress abiotique le plus important pour le pois. L'aridité et les températures élevées apparaissent ensemble dans plusieurs régions de production de légumineuses, dont les deux types de stress peuvent interagir pour réduire les rendements (Rubiales *et al.*,

2012). De plus, la sécheresse peut arrêter la fixation de l'azote et diminuer la production de biomasse (Cousin, 1997).

En outre, la salinité est aussi un stress important du pois (Saxena, 1993). Le pois est modérément sensible aux désordres nutritionnels. Les plants de pois souffrent parfois d'un manque de bore, de carence en calcium, de carence en fer et en magnésium (Claude *et al.*, 1994).

1.7.2. Stress biotiques

1.7.2.1. Ravageurs et parasites

Les insectes comme les pucerons, les thrips et le charançon sont les principaux ravageurs qui peuvent endommager le pois cultivé ainsi que ses graines (Kraft et Pflieger, 2001). Le puceron du pois, dont la distribution est mondiale, est le seul puceron qui cause des pertes importantes aux pois destinés au marché des produits frais et du surgelé, ainsi qu'aux pois secs destinés à l'industrie de la soupe en conserve et de l'alimentation animale. Le pois est également affecté par un certain nombre de nématodes tels que *Meloidogyne hapla* et *Ditylenchus dipsaci* (Claude *et al.*, 1994).

1.7.2.2. Principales maladies bactériennes et virales

Les bactérioses les plus redoutables du pois sont la brûlure bactérienne causée par *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, qui provoque des pertes économiques significatives particulièrement pendant le printemps et l'été, et la maladie des taches brunes causée par *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Cousin, 1997).

Les maladies virales sont dommageables dans la plupart des régions du monde où les pois sont cultivés (Redden *et al.*, 2005). Il y a plus de 50 virus connus pouvant infecter le pois (Kraft et Pflieger, 2001). Le plus important parmi eux est le virus de la mosaïque du pois (PSbMV : *Pea Seed borne Mosaic Virus*) qui a été disséminé dans le monde entier par les graines infectées (Khetarpal *et al.*, 1990 ; Cousin, 1997). La maladie s'est également transmise par les pucerons (Kraft et Pflieger, 2001). Le pois peut également être affecté par d'autres virus, tels que le virus de l'enroulement des feuilles du pois (PLRV : *Potato Leaf Roll Virus*), le virus de la mosaïque et d'énation du pois (PEMV : *Pea Enation Mosaic Virus*) appelé également le virus 1, la mosaïque du pois provoquée par le virus 2 du

haricot (BV2: *Bean Virus 2*), le virus de la mosaïque commune du pois (PCMV :*Pea Commun Mosaic Virus*) et le virus de brunissement précoce de pois (Cousin, 1997) .

1.7.2.3. Principales maladies fongiques

La variation du rendement du pois est souvent associée à des attaques fongiques. Les maladies importantes de cette récolte incluent des maladies fongiques foliaires et racinaires (Claude *et al.*, 1994).

Les ascochytozes sont causées par trois champignons étroitement apparentés. On trouve ces maladies partout où le pois est cultivé, particulièrement dans les zones tempérées. Les pertes peuvent atteindre 50 % chez le pois de conserverie, surtout s'il est infecté par *Mycosphaerella pinodes* (Claude *et al.*, 1994). La septoriose causée par *Septoria pisi*, est commune chez le pois. Elle affecte principalement les feuilles âgées et a donc peu d'effets sur les rendements du pois (Claude *et al.*, 1994) .

Le mildiou causé par *Peronospora pisi*, se développe par temps frais et humide et ne se dissémine que dans les régions côtières ou dans les régions fraîches et humides. Les oospores du *P. pisi* sont produites en grand nombre dans les tissus malades et c'est sous cette forme que le champignon hiverne dans la graine, le sol et sur les résidus de culture. Certaines peuvent survivre dans le sol pendant 10 à 15 ans (Claude *et al.*, 1994) .

L'oïdium est une maladie commune, mais elle cause rarement des dommages sur les petits pois de conserve parce qu'on les récolte habituellement avant que la maladie ne devienne grave. Il est plus fréquent chez le pois potager tardif et sur le pois fourrager. Le champignon responsable de l'oïdium *Erysiphe pisi*, infecte de nombreux hôtes et se trouve sur plus de 350 espèces de plantes. Le parasite existe en de nombreuses races physiologiques, chacune d'entre elles n'affectant que les cultures les plus apparentées (Claude *et al.*, 1994) .

Les graines, les tiges et les racines du pois peuvent être infectées par de nombreux parasites fongiques telluriques, du semis à la récolte. Ces champignons provoquent des symptômes de flétrissement, de nécrose des racines et du collet,

de fonte et de brûlure des semis et de pourriture des graines, ce qui rend difficile à différencier les uns des autres. Bien que *Pythium* et *Rhizoctonia* ont une large gamme d'hôtes, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lisi* et *F.solani* f. sp. *lisi* sont monophagiques et ne sont pathogènes que sur le pois (Claude *et al.*, 1994) .

2. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lisi* (Fop)

2.1. Généralité

Le genre *Fusarium* a été découvert par Link en 1809 pour des champignons ayant des conidies sous forme de canot ou de banane (Fourie *et al.*, 2011). En 2013, la base de données *Fusarium-ID* a énuméré 76 espèces distinctes de *Fusarium* basées sur le séquençage du gène facteur 1 alpha (EF-1 α) de la traduction et de l'élongation (Chakrabarti, 2013).

Fusarium est considéré comme l'un des genres les plus adaptables et les plus maniabiles des *Eumycota*. L'une des espèces les plus importantes est *Fusarium oxysporum* qui est composée de souches pathogènes et non pathogènes (Gordon et Martyn, 1997). *F. oxysporum* est un champignon d'origine tellurique cosmopolite, qui présente une très grande diversité génétique et écologique. Cette espèce inclut plus d'une centaine de formes spéciales et races qui sont chacune spécifique à une plante hôte, souvent des espèces végétales d'intérêt horticole, maraîcher ou agronomique. *F. oxysporum* inclut également des populations non pathogènes pour lesquelles aucune plante hôte n'a été identifiée à ce jour (Barik *et al.*, 2010 ; Arroyo-Garcia *et al.*, 2003).

Les espèces phytopathogènes de *F. oxysporum* causent des maladies importantes sur les cultures, en induisant spécialement le flétrissement vasculaire (Tello et Lacas, 1990). Cette maladie attaque plusieurs plantes pérennes et annuelles, aussi bien dans les zones tempérées que dans les zones tropicales causant leur jaunissement et leur flétrissement (Di Pietro, 2003). Le haut niveau de spécificité des souches pathogènes de *F. oxysporum* a conduit à la détermination des formes spéciales (*formae specialis*, f. sp.) ce qui permet la différenciation de ces souches morphologiquement similaires (Cunnington, 2009). Chaque forme spéciale peut être divisée en races physiologiques et chaque race

physiologique montre un modèle caractéristique de virulence sur des variétés différentielles dans la même espèce hôte (Agrios, 2005 ; Armstrong et Armstrong, 1981).

Fusarium oxysporum f. sp. *pisi* (*Fop*) est un pathogène important et destructeur du pois (*Pisum* spp). Il a été rapporté dans tous les pays où le pois est cultivé (Kraft et Pflieger, 2001). Cet agent pathogène transmis par le sol peut survivre sous forme de chlamydospores à paroi épaisse, qui restent viables dans le sol pendant plus de 10 ans (Kraft, 1994).

2.2. Taxonomie et caractères morphologiques

F. oxysporum est un Deutéromycète tellurique appartenant à la sous classe des *Hyphomycètes* et à la famille des *Tuberculariacées* (Messiaen et Cassini, 1968 ; Booth, 1971 ; Nelson *et al.*, 1983). L'approche principale pour la classification de *Fusarium* est toujours la morphologie, et le caractère essentiel pour les espèces à placer dans ce genre est la production de spores asexuées : les macroconidies en forme de banane distinctive, les microconidies et les chlamydospores (Figure 3) (Leslie *et al.*, 2001 ; Burgess *et al.*, 1994).

Dans un milieu de culture solide, comme le milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*), les différentes formes spéciales de *F. oxysporum* peuvent varier d'apparence. Généralement, au début de la croissance, le mycélium aérien est blanc et peut ensuite changer vers une large variété de couleurs (du violet jusqu'au pourpre foncé) selon la souche de *F. oxysporum* (ou forme spéciale). Si les sporodochia (amas de conidiophores provenant d'un stroma ou masse d'hyphes) sont abondants, la culture apparaîtra de couleur crème ou orange (Smith *et al.*, 1988).

Des macroconidies cloisonnées peuvent être produites sur monophialides et polyphialides dans le mycélium aérien, mais aussi sur monophialides courtes dans des structures spécialisées appelées sporodochia (Leslie et Summerell, 2006). Le monophialide est une cellule de conidies avec un pore unique à partir de laquelle les conidies sont libérées. Un polyphialide peut posséder plusieurs de ces ouvertures. Les Microconidies peuvent varier en forme et en taille, et sont produites dans le mycélium aérien en touffes ou en chaînes, à la fois sur

monophialides et polyphialides (Leslie *et al.*, 2007). Ces microconidies ont souvent la forme d'une virgule ou sont ellipsoïdales (Agrios, 2005 ; Nelson *et al.*, 1983).

Les chlamydospores sont des formes de résistance avec des parois plus épaisses et une teneur élevée en lipides. Dans le cas de leur présence, elles peuvent se former au milieu des hyphes ou à leur extrémité (Leslie *et al.*, 2007). Elles sont des spores rondes composées d'une ou de deux cellules, entourées d'une paroi épaisse plus ou moins pigmentée. Elles sont déposées en paires, en triplets ou rarement en forme rassemblée (Agrios, 2005 ; Nelson *et al.*, 1983).

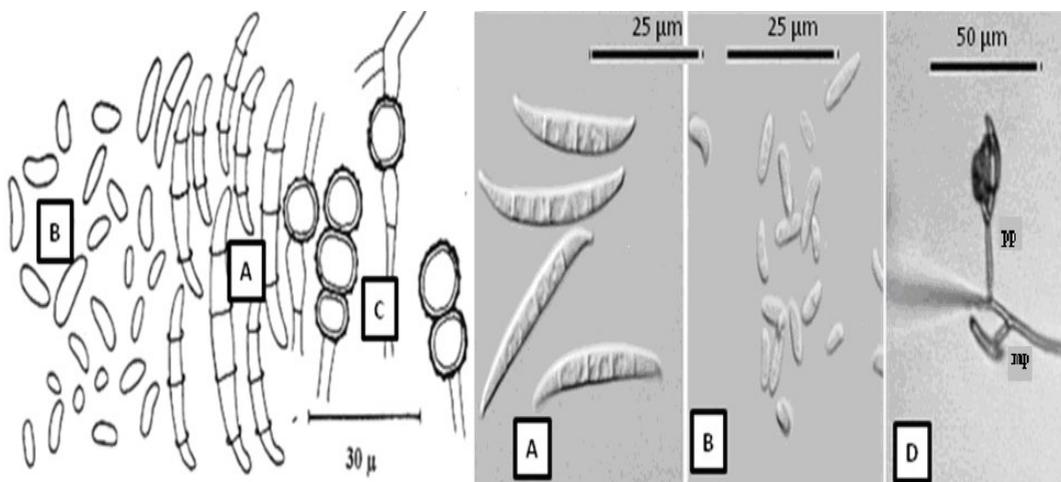


Figure 3. Caractères microscopiques de *Fusarium oxysporum* (Leslie et Summerell, 2006).

(A) Macroconidies ; (B) microconidies ; (C) chlamydospores et (D) microconidies produites *in situ* par monophialide et polyphialides.

2.3. Les races de *Fop*

En 1933, Snyder a décrit une autre race de *F. oxysporum* capable de causer le flétrissement chez des variétés résistantes à la race 1, et qui a été dénommée la race 2. Cette nouvelle race apparaît plus tard dans la période de végétation, souvent seulement durant le développement des gousses (Haglund, 1984). Les races 3 et 4 ont été ensuite décrites aux Pays Bas et au Canada, respectivement. Cependant, ces deux races ont ensuite été regroupées dans la race 2 étant des formes dérivées plus virulentes de la race 2 (Kraft, 1994). En 1970, la race 5 a été décrite au nord-ouest de l'état de Washington (Etats Unis), où tous les cultivars

commerciaux connus résistants aux races 1 et 2, étaient susceptibles (Haglund *et al.*, 1970).

En 1979, une nouvelle race de *Fop* a été décrite à l'ouest de l'état de Washington, qui était pathogène sur des cultivars et des lignées améliorées résistants aux races 1, 2 et 5, et a été dénommée la race 6 (Haglund *et Kraft*.,1979). A l'heure actuelle, quatre races de *Fop* ont été identifiées, les races 1 et 2 décrites dans le monde entier, alors que les races 5 et 6 sont seulement importantes à l'ouest de l'état de Washington aux Etats-Unis (Infantino *et al.*, 2006).

3. La fusariose vasculaire du pois

3.1. Historique de la maladie

La fusariose vasculaire du pois a été décrite la première fois et distinguée de la pourriture racinaire par Jones et Linford (1925) qui l'ont appelée « la maladie du flétrissement méconnu ». A ce moment, la maladie a été signalée dans 50 parcelles à Wisconsin aux Etats-Unis, où elle a causé des pertes économiques plus importantes que celles rapportées pour la pourriture racinaire (Jones et Linford, 1925). L'agent causal a été appelé *F. othoceras* var. *pisi* (Linford, 1928). Le pathogène a été nommé plus tard race 1 de *F. oxysporum* f. sp. *pisi* en 1935 (Goth et Webb, 1981).

3.2. Cycle d'infection

L'infection par *F. oxysporum* est initiée par la germination des spores dans le sol en réponse à un signal indéterminé dans les exsudats des racines de l'hôte (Di Pietro *et al.*, 2003). Lors de la germination, les hyphes infectieux adhèrent à la surface de la racine et pénètrent directement à travers l'épiderme des racines sans formation d'une structure spécialisée (Figure 4) (Bishop et Cooper, 1983 ; Rodriguez et Mendgen, 1995).

Le mycélium avance alors inter ou intracellulairement par le cortex de la racine, jusqu'à ce qu'il atteigne les vaisseaux du xylème (Bishop et Cooper, 1983 ; Beckman, 1987). a ce stade, le champignon passe au mode endophytique, au cours duquel il reste exclusivement dans les vaisseaux du xylème. Par la suite,

il peut s'infiltrer par la production de microconidies qui migrent vers le haut avec le flux de la sève pour coloniser rapidement l'hôte (Bishop et Cooper, 1983).

Les symptômes caractéristiques de la fusariose vasculaire apparaissent à cause du fort stress hydrique provoqué par la prolifération fongique, combinée avec des réactions de défense de l'hôte. Aux stades avancés de l'infection, quand la plante est morte, le champignon passe du mode biotrophe au mode nécrotrophe, en envahissant le parenchyme de l'hôte et en sporulant d'une façon abondante (production des grandes quantités de conidies et de chlamydo-spores) (Chakrabarti, 2013). Le pathogène survit sur les débris des plantes infectées dans le sol sous forme de mycélium et sous toutes ses formes de spores, mais le plus souvent sous forme de chlamydo-spores dans les régions tempérées plus fraîches (Agrios, 2005).

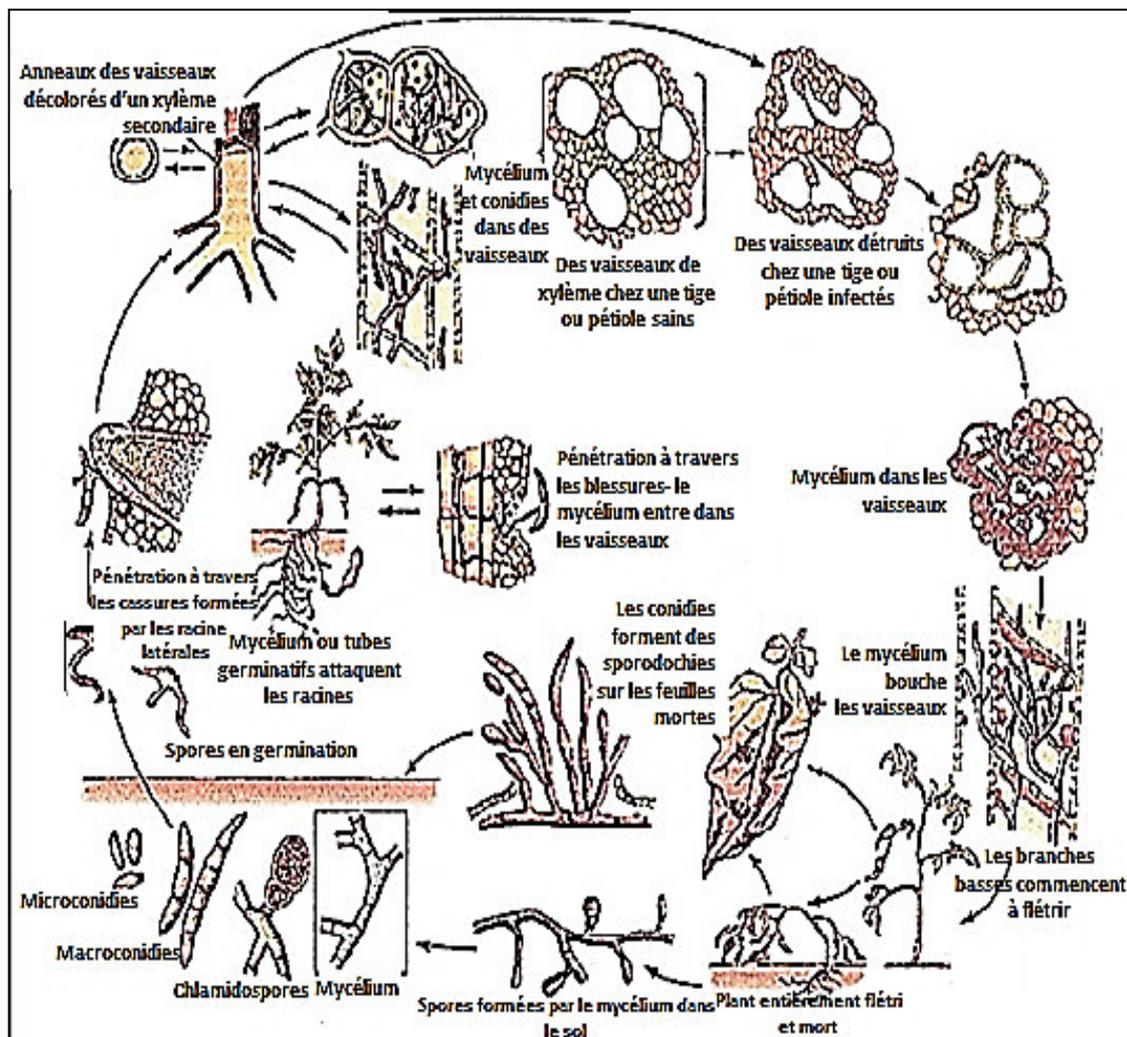


Figure 4. Cycle infectieux de *Fusarium oxysporum* (Agrios, 2005).

3.3. Transmission

Snyder (1932) a rapporté que la race 1 de *Fop* peut être transmise par graines lors de la récolte à partir d'un champ infesté. Parmi 8 000 graines testées, seulement 4 graines ont pu transmettre le pathogène, en suggérant que parfois les petites particules du sol peut être logées par le champignon (Snyder, 1932).

La race 1 de l'agent pathogène peut être isolée à partir des nœuds de la tige lorsque le premier se développe sur une plante flétrie. Bien qu'aucune preuve n'ait été présentée, il est possible que l'agent pathogène ne puisse envahir le pédoncule et donc la gousse et les graines. La probabilité de transmission par semences de la race 2 de *Fop* qui infecte la plante au stade floraison et de développement des gousses, est beaucoup plus élevée que pour la race 1, 5, ou 6 qui tuent habituellement la plante avant la floraison (Snyder, 1932).

3.4. Mécanismes parasitaires

3.4.1. Les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire

Quand ils envahissent les plantes, les champignons phytopathogènes doivent traverser des barrières physiques telles que la paroi cellulaire de la plante, essentiellement composée de polysaccharides et de pectine. Chez *F. oxysporum*, l'absence de structures spécialisées, telles que les appressoriums, a toujours été un facteur important liant sa pénétration avec des enzymes de dégradation de la paroi végétale (CWDEs : *Cell Wall Degrading Enzymes*). Plusieurs enzymes, telles que les exo- et les endo-polygalacturonases, l'endoxy lanase et la pectate-lyase ont été purifiées, caractérisées et clonées chez des isolats phytopathogènes de *F. oxysporum* (Chakrabarti, 2013).

3.4.2. Production de toxines

Le genre *Fusarium* est connu pour produire une large gamme de toxines (mycotoxines et phytotoxines). Chez *F. oxysporum*, deux toxines ont été identifiées pour être capables d'induire les symptômes typiques de la maladie. Il s'agit de la lycomarasmine et de l'acide fusarique. La production *in planta* de la lycomarasmine a été démontrée chez plusieurs plantes, telles le coton, la tomate et le pois. Cependant la production de cette toxine ne peut pas être corrélée avec la pathogénicité du champignon (Pegg, 1981).

L'acide fusarique est une toxine non spécifique produite par plusieurs espèces de *Fusarium* (Abouzeid *et al.*, 2004). A de fortes concentrations, il induit plusieurs réactions physiologiques dans la cellule végétale, telles que la perturbation de la croissance cellulaire, de l'activité mitochondriale et de la perméabilité de la membrane plasmique. A de faibles concentrations, il peut déclencher les réactions de défense de la plante et la mort cellulaire programmée (Jiao *et al.*, 2013).

Outre que l'acide fusarique, les isolats de *F. oxysporum* peuvent produire d'autres toxines telles que la beauvericine, l'enniantine B, la bikaverine, la moniliformine, la fumonisine et les trichothécènes qui peuvent aussi contribuer à leur pathogénicité (Irzykowska *et al.*, 2012).

3.4.3. Autres mécanismes

La détoxification enzymatique des phytoalexines, les voies de signalisation par les protéines kinases (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinases*) et les protéines G, le fonctionnement des peroxysomes, les facteurs multiples de transcription et récemment les protéines effectrices, sont des mécanismes qui sont impliqués dans le processus d'infection des plantes par *F. oxysporum* (Di Pietro *et al.*, 2003 ; Michielse et Rep, 2009). Le gène *fmk1* codant pour une MAPK et sa cible principale le facteur de transcription *Ste12* a été isolé chez *F. oxysporum*. Il a été démontré que la signalisation par les MAPK est impliquée dans l'adhésion des spores à la surface des racines, le développement de l'hyphe de pénétration, la croissance invasive et la production de la pectate lyase (Di Pietro *et al.*, 2001 ; Rispaill et Di Pietro, 2009).

3.5. Mécanismes de défense de la plante

Pour faire face aux infections par les phytopathogènes, la plante possède différents mécanismes de résistance. Il existe des barrières physiques préformées de la plante. La première ligne de défense physique préformée peut être présentée aux différents niveaux en recouvrant la surface des organes de la plante (racine, tige). Il s'agit de la cuticule, de l'épiderme et de l'écorce (Dubreuil, 2010). Ces barrières préexistantes peuvent être contournées par les microorganismes où le pathogène doit recourir aux ouvertures naturelles ou artificielles (stomates et blessures) (Compant, 2007).

Une fois que l'agent pathogène pénètre dans la plante, la diminution du pH, les enzymes de dégradation ou les composés antimicrobiens produits par la plante permettent de restreindre l'infection (Compant, 2007). Les phénols, les glycosides phénoliques, les lactones non saturées, les composés sulfuriques, les saponines, les glycosides cyanogéniques et les glucosinolates sont des composés constitutifs des plantes qui ont aussi une activité antifongique (Mansfield, 1983 ; Osbourn, 1996).

La réponse hypersensible produite par la mort des cellules parenchymateuses des tissus vasculaires infectés par le champignon a également été observée sur des racines de plantes infectées par *F. oxysporum* (Beckman et al., 1989). Dans un premier stade d'hydrolyse de la paroi cellulaire, des mécanismes physiques sont impliqués, en utilisant la lignine et des composés phénoliques de la paroi pour restreindre l'action des CWDEs du pathogène sur la paroi cellulaire de l'hôte. Un deuxième mécanisme chimique se produit à un stade ultérieur pour éviter la production de CWDEs par l'agent pathogène. Cette inhibition est liée à la participation des phénols estérifiés dans la paroi cellulaire (El Modafar et El Boustani, 2002 ; Vidhyasekaran, 2008).

La production de composés antifongiques est également une stratégie de base de défense chez la plante (Dixon, 2001). Elle comprend la production et l'accumulation de composés antimicrobiens, appelés phytoanticipines et phytoalexines, dans le site d'infection (Mert-Turk, 2002). Des peptides antimicrobiens et des espèces réactives d'oxygène peuvent être aussi produits lors d'une infection parasitaire (Lamb et Dixon, 1997 ; Garcia-Olmedo et al., 1998). Une protéine antifongique ayant une masse moléculaire de 31kDa, a été isolée chez la variété macrocarpon de *Pisum sativum*. La protéine, appelée pisumine, a montré une activité antifongique envers *F. oxysporum* et *Rhizoctonia solani* (Ye et Ng, 2003). Une autre protéine antifongique ayant une masse moléculaire de 11 kDa, a été aussi isolée à partir des graines de *Pisum sativum* var. *arvense* Poir, qui a montré son activité inhibitrice envers *F. oxysporum* (Wang et Ng, 2006).

Chez la plupart des plantes, les gènes conférant une résistance dominante envers les pathogènes, codent des protéines impliquées dans la reconnaissance spécifique de la race du pathogène. La relation gène pour gène accorde à une forte résistance codée par les gènes *R*, envers les pathogènes qui expriment des gènes d'avirulence (*avr*) correspondants (Nimchuk *et al.*, 2003). Les gènes *R* codent deux catégories de protéines riches en leucine (LRR : *Leucine-Rich-Repeat*) menées d'un site de perception du pathogène (Jones et Takemoto, 2004). Le signal reconnu par une protéine *R* peut assumer diverses formes, telles que des protéines effectrices, des activités enzymatiques de ces protéines ou des métabolites polyketides (Nimchuk *et al.*, 2003 ; Diener et Ausubel, 2005).

En contraste avec la forte résistance codée par un seul gène *R*, la résistance de l'hôte et souvent oligogénique, reportée à une résistance horizontale, est identifiée par des locus multiples à traits quantitatifs (QTL : *Quantitative Trait Loci*) (Diener et Ausubel, 2005). Les deux types de résistance monogénique et oligogénique envers *F. oxysporum*, ont été décrites chez plusieurs espèces végétales (Sherbakoff, 1949 ; Beckman et Roberts, 1995).

3.6. Symptômes et conditions favorables

Les hautes températures et les sols humides sont les conditions favorables au développement de la fusariose vasculaire. Le pathogène apparaît le plus souvent dans des zones mal drainées du champ. Une température du sol de 21 à 25° C est généralement plus favorable pour que *Fop* puisse causer la maladie, bien que la race 5 peut infecter les plantes hôtes à des basses températures (Hagedorn, 1984 ; Kraft *et al.*, 2001).

Les symptômes sont caractérisés par un léger jaunissement initial du feuillage et un flétrissement des feuilles supérieures qui progresse en l'espace de quelques jours jusqu'à un flétrissement permanent, dont les feuilles restent attachées (Figure 5.A). Le système vasculaire de la plante se décolore, particulièrement au niveau du collet et de la racine. Généralement, la maladie apparaît dans des emplacements bien délimités du champ au sein desquels un grand nombre des plantes flétrissent et meurent (Black *et al.*, 1993).

L'infection par les races 1, 5 et 6 de *Fop* provoque l'enroulement des feuilles et des stipules vers le bas, l'épaississement de l'entre-nœud basal, le jaunissement et les nécroses des feuilles et les tiges deviennent plus fragiles. Bien que le système racinaire apparaisse normal, le tissu vasculaire de la racine et de la tige peut devenir jaune à orange (Figure 5.B). Cette décoloration vasculaire s'étend souvent à la tige supérieure. Durant le développement de la maladie, le jaunissement se progresse des feuilles inférieures vers l'apex de la tige (Figure 5.A). La fusariose se développe rapidement entraînant la mort des plantes infectées (Bani, 2015).

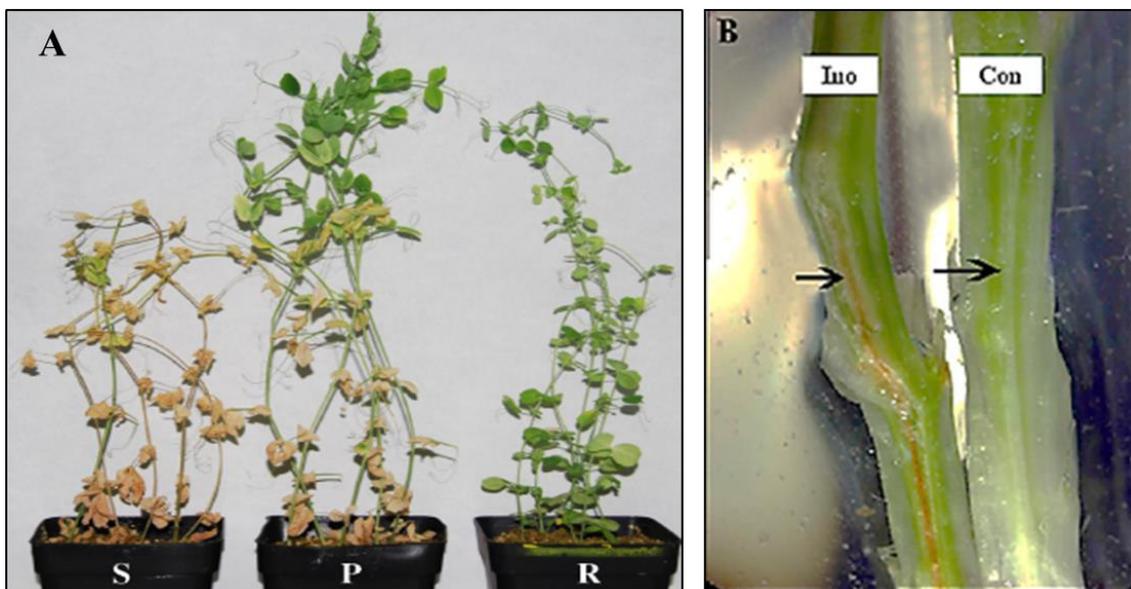


Figure 5. Symptômes de la fusariose vasculaire sur pois (Castillejo *et al.*, 2015 ; Bani, 2015).

(A) Symptômes sur un génotype (S) sensible, (P) partiellement résistant et (R) résistant. (B) Décoloration des tissus vasculaires.

Les symptômes de la race 2 sur les plantes individuelles sont semblables aux symptômes d'autres races de *Fop*. Cependant, les symptômes de plein champ consistent seulement à des plantes présentant des symptômes occasionnels sauf si le niveau d'inoculum est extrêmement élevé. Les symptômes de la race 2 se produisent habituellement plus tard en pleine croissance, souvent à la floraison. La décoloration vasculaire causée par la race 2 est généralement plus intense que les autres races allant de l'orange au rouge foncé (Kraft et Pflieger, 2001).

3.7. Contrôle de la maladie

Le contrôle des agents phytopathogènes est principalement basé sur trois stratégies : les pratiques culturales, l'application des produits agrochimiques et l'utilisation de variétés résistantes (Guimaraes *et al.*, 2007).

3.7.1. Lutte culturale

La rotation des cultures est la meilleure pratique culturale qui peut contribuer à la réduction des dégâts causés par les phytopathogènes fongiques. Cependant, elle n'a qu'un effet mineur dans la résolution des problèmes de pois causés par la fusariose vasculaire, non seulement parce que les chlamydospores de *Fop* survivent très longtemps dans le sol, mais aussi parce que l'inoculum peut se multiplier sur les racines des hôtes porteurs asymptomatiques (Keiko et Nagisa, 2005).

3.7.2. Lutte chimique

La fumigation du sol avec un fongicide à large spectre est une méthode de lutte potentiel qui fournit un bon contrôle préventif, bien que la recolonisation du sol par *Fop* se déroule très rapidement (Keiko et Nagisa, 2005). En outre, la fumigation des sols est coûteuse pour l'application aux champs et en raison de l'impact négatif des produits chimiques sur les organismes non cibles et le potentiel de risque pour l'environnement et la santé, la gamme et le taux de fongicides utilisée a été progressivement limitée et certains d'entre eux ont été éliminés, tels que le bromure de méthyle (Duniway, 2002).

3.7.3. Lutte biologique

Durant ces dernières années, le contrôle biologique de la fusariose a donné des résultats encourageants. Le biocontrôle consiste à utiliser des champignons antagonistes tels que les souches non pathogènes de *F. oxysporum*, *Trichoderma* et *Gliocladium*, et des bactéries telles que *Pseudomonas fluorescens* et *Burkholderia cepacia* (Benchabane *et al.*, 2000 ; Pal et McSpadden-Gardener, 2006 ; Toua *et al.*, 2013). Bien que promettant, aucun de ces microorganismes n'a été utilisé pour contrôler la fusariose en pratique jusqu'à présent (Bani, 2015).

3.7.4. Lutte génétique

L'utilisation des variétés résistantes du pois a été considérée comme la seule mesure pratique et économique pour contrôler la maladie en plein champ. La résistance aux quatre races de *Fop* est contrôlée par des gènes dominants et héréditaires. La résistance à la race 1 est contrôlée par un seul gène dominant (*Fw*) qui est intégré dans la plupart des variétés cultivées (Grajal-Martin et Muehlbauer, 2002).

La résistance horizontale a été identifiée, mais elle reste incomplète. Donc, quand le potentiel de la maladie est élevé, les cultivars meurent ou se mûrissent précocement que les plantes indemnes de maladie, ce qui cause une perte de rendement et de la qualité de congélation ou la mise en conserve des graines de pois (Hagedorn, 1984 ; Kraft et Pflieger, 2001).

Chapitre II.

Matériel et méthodes

1. Etude de comportement des quelques génotypes de pois vis-à-vis de la fusariose vasculaire

1.1. Matériel végétal

Une collection de 15 génotypes issus de populations spontanées de *Pisum* spp., a été étudiée (Figure 6). Il s'agit de 2998, 2995, 3044, 2714, 2329, P648, P26, 3068, 3030, 3106, 2372, 2367, 26, 2905 et 3034. De plus, trois génotypes contrôles : Merveille de Kelvedon (résistant), P21 et 2946 (sensibles), appartenant à la l'espèce *P. sativum*, ont été utilisés (Bani *et al.*, 2012, Mekhaldi, 2016). Les semences des différents génotypes ont été issues de l'Institut de l'Agriculture Durable de Cordoue (*Institut of Sustainable Agriculture Cordoba, Spain*).



Figure 6. Semences des génotypes de pois étudiés.

1.2. Souches de *Fop*

Deux souches de *Fop* ont été utilisées: R1 et R2F42 (Figure 7). La souche R1 appartient à la race 1 du champignon tandis que la souche R2F42 appartient à la race 2. Ces souches ont été gracieusement fournies par l'Institut de l'Agriculture Durable de Cordoue (*Institut of Sustainable Agriculture, Cordoba, Spain*).

A partir de ces deux souches, des repiquages de manière aseptique sont effectués : des explants de culture ne présentant aucune contamination sont prélevés au niveau de la zone périphérique des colonies. L'opération est renouvelée jusqu'à obtention d'une culture pure. Après incubation, des observations microscopique sont effectuées présentant les caractères *Fusarium oxysporum* f.sp .*pisi* (Champion, 1997). Afin de les régénérer, Les souches ont été cultivées sur le milieu PDA et incubées à 28°C pendant 4 à 5 jours.

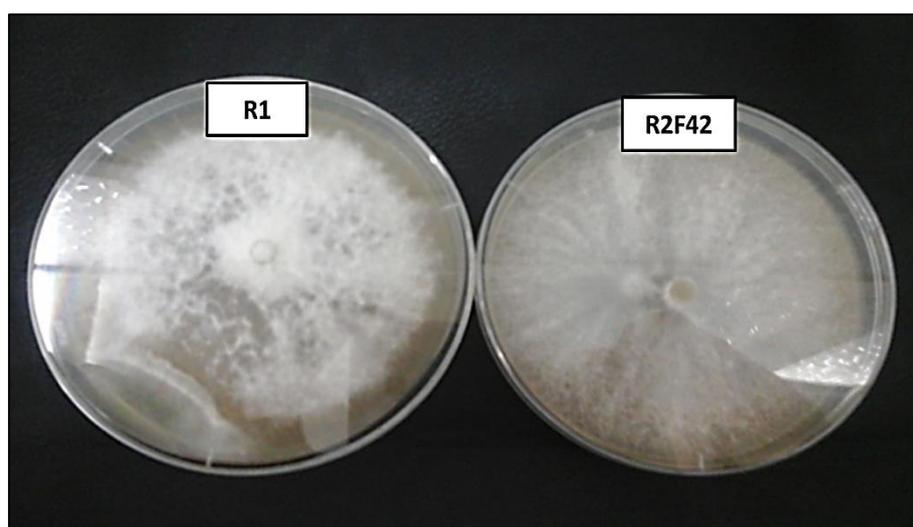


Figure 7. Cultures des deux souches de *Fop* utilisées.

1.3. Prégermination des graines

Les graines du pois ont été superficiellement désinfectées dans une solution d'hypochlorite de sodium (1%) pendant 30 min à température ambiante afin d'éliminer toutes traces d'infections superficielles préexistantes (Figure 8.A). La désinfection a été suivie de deux rinçages à l'eau distillée stérile pendant 20 minutes pour chaque rinçage. Les graines ont été par la suite séchées sur papier filtre stérile, puis enveloppées dans un papier stérilisé et humecté et placées dans

des boîtes de Pétri. Pour stratifier les graines, les boîtes ont été couvertes avec du papier aluminium et mises à 4°C pendant 4 jours. Après stratification, les boîtes ont été incubées à 25°C jusqu'à la germination des graines (Mekhaldi 2016) (Figure 8.B).

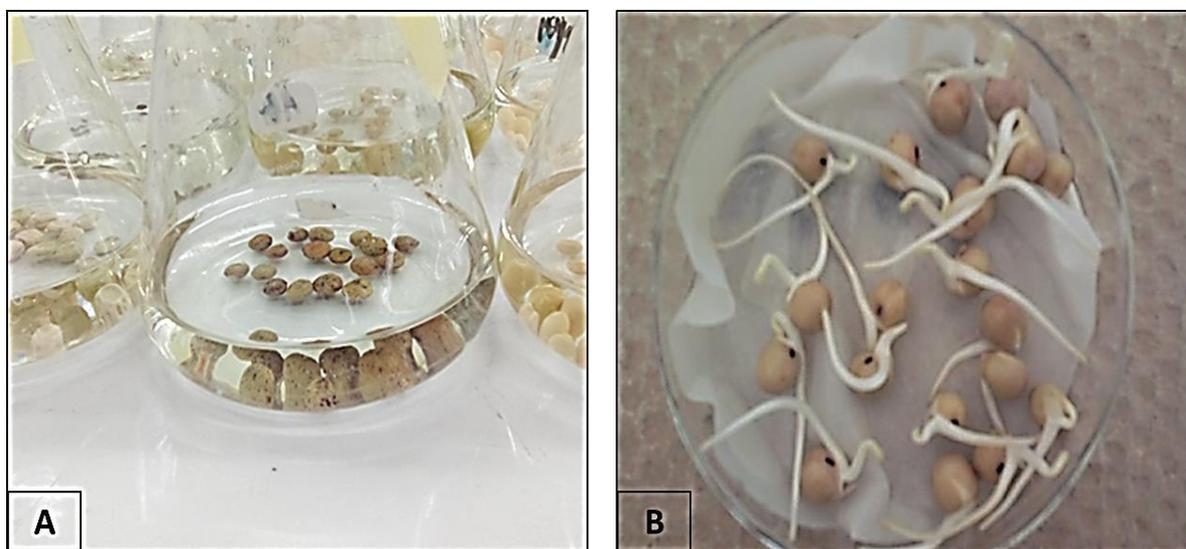


Figure 8. Désinfection et pré germination des graines.

(A) Désinfection et (B) germination des graines.

Une fois germées, les graines ont été transférées dans des pots en plastiques de 250 ml de volume contenant de la perlite stérile et maintenues sous serre. Les plantules sont arrosées avec de l'eau courante selon le besoin.

1.4. Préparation de l'inoculum

Selon la technique décrite par Di Pietro et Roncero (1998), les suspensions fongiques ont été préparées en prélevant des disques mycéliens à partir des cultures de *Fop* âgées de 4 à 5 jours (sur milieu PDA) (Figure 9.A). Les disques ont été mis dans des flacons contenant 200 ml du milieu liquide PDB à raison de 5 à 6 disques par flacon et incubés à la température ambiante, sous agitation continue (170 rpm) (Figure 9.B).

Après 5 jours, les spores ont été récupérées par filtration de la suspension à travers les mailles de 2 compresses stériles. A l'aide d'une cellule de Malassez, la concentration des filtrats a été mesurée puis ajustée à 5×10^6 spores/ml (Figure 9.C) (Haglund, 1989).

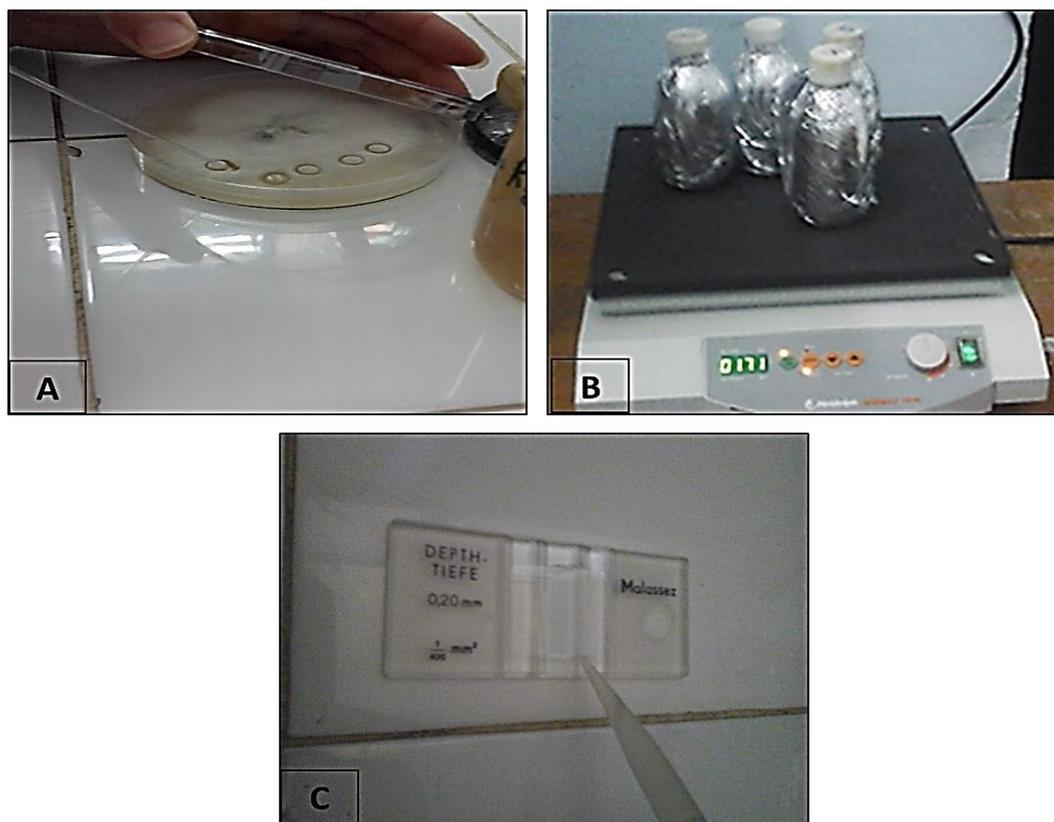


Figure 9. Préparation de l'inoculum.

(A) Prélèvement des disques mycéliens, (B) mise en agitation des suspensions fongiques de *Fop* et (C) mesure de la concentration à l'aide d'une cellule de Malassez.

1.5. Inoculation des plantules

Pour procéder à l'inoculation des plantes avec les souches de *Fop*, nous avons utilisé la technique d'immersion des racines (Haglund, 1989). Au stade 2 à 3 nœuds, les plantules ont été dépotées (Figure 10.A) et leurs racines ont été nettoyées par lavage à l'eau du robinet pour enlever la perlite adhérente. Un tiers du système racinaire a été coupé (Figure 10.B) avant l'immersion du reste de la racine dans la suspension de spores, pendant 5 min à la température ambiante (Figure 10.C). Après l'inoculation, les plantules du pois ont été transplantées dans leurs pots et incubées sous serre jusqu'à la fin de l'expérimentation.



Figure 10. Inoculation des plantes du pois.

(A) Dépotage des plantes, (B) coupure et (C) Immersion des racines dans la suspension fongique.

1.6. Traitements appliqués

Notre expérimentation a pour objectif d'étudier l'interaction de deux facteurs (Tableau 1):

- Le facteur « génotype » est composé de 18 niveaux correspondant aux 18 génotypes de pois étudiés (y compris les génotypes contrôles).
- Le facteur « souche » comprend 3 niveaux correspondant aux deux souches et aux témoins pour lesquels la suspension de *Fop* a été remplacée par de l'eau distillée stérile (EDS) lors de l'inoculation.

Le nombre total des traitements était 54 (Tableau 1), dont chaque traitement a été répété 5 fois, soit un total de 270 plantes (unités expérimentales).

Tableau 1. Les différents traitements appliqués.

Génotypes	<i>Fop</i> R1	<i>Fop</i> R2F42	EDS
2998	T1	T19	T37
2995	T2	T20	T38
3044	T3	T21	T39
2714	T4	T22	T40
2329	T5	T23	T41
P648	T6	T24	T42
P26	T7	T25	T43
3068	T8	T26	T44
3030	T9	T27	T45
3106	T10	T28	T46
2372	T11	T29	T47
2367	T12	T30	T48
26	T13	T31	T49
2905	T14	T32	T50
3034	T15	T33	T51
M. Kelvedon	T16	T34	T52
P21	T17	T35	T53
2946	T18	T36	T54

1.7. Evaluation de la maladie

1.7.1. Suivi symptomatologique

Les observations symptomatologiques concernent le suivi et le contrôle du développement des symptômes typiques de la fusariose vasculaire du pois sur les parties aériennes (symptômes externes) et au niveau du système vasculaire (symptômes internes). Les symptômes externes s'expriment par un flétrissement et un jaunissement des feuilles suivis par un dessèchement et/ou la mort de la plante (Bani *et al.*, 2012).

Une coloration rougeâtre des tissus de la tige et du collet de la plante a été précédemment décrite pour être associée aux infections par *F. oxysporum* (Kraft *et al.*, 2001). Afin d'observer ces symptômes internes, nous avons examiné des coupes des plantes inoculées par les deux souches de *Fop*, sous une loupe

binoculaire (G : ×8). Pour cela, les plantes inoculées ont été dépotées 30 jours après l'inoculation puis lavées sous l'eau du robinet. La tige et la partie supérieure du système racinaire ont été longitudinalement coupées, à l'aide d'un scalpel et observées sous une loupe binoculaire.

1.7.2. Calcul du taux d'infection

Pour chaque plante, nous avons calculé le taux d'infection, représenté par la proportion de feuilles symptomatiques par rapport au nombre total de feuilles. Le taux d'infection se calcule selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'infection (\%)} = \frac{\text{Nombre de feuilles symptomatiques}}{\text{Nombre total des feuilles}} \times 100$$

Les génotypes présentant une valeur de taux d'infection inférieure ou égale à 50% sont considérés comme résistants, les génotypes présentant des taux d'infection entre 50 et 70% sont classés comme partiellement résistants alors que les génotypes avec des valeurs de taux d'infection dépassant 70% sont considérés comme sensibles (McPhee *et al.*, 1999).

Les résultats des taux d'infection ont subi une analyse de variance (ANOVA) en utilisant le logiciel statistique « Systat » vers. 12. Le calcul des moyennes des taux d'infection a été effectué en utilisant le même logiciel, dont les différences sont significatives en se basant sur la plus petite différence au seuil $\alpha \leq 5\%$.

2. Traçage de la continuité de la sève

Pour déterminer la continuité de l'eau et de flux des éléments nutritifs au sein des plantes, nous avons déterminé la capacité de rétention et du transport d'une solution du traceur colorant qui est le bleu de naphtol (Figure 11. A). Pour cela, des plantes inoculées avec la souche R2F42 de *Fop* ont été récupérées 30 jours après leur inoculation et lavées de la perlite sous l'eau du robinet. Les racines des plantes ont été immergées dans une solution de 0,1% de bleu de naphtol dans des tubes en verre de 50 ml (Figure 11.B) pendant 12 h dans une chambre d'environnement contrôlé à 28°C. La continuité de l'eau et de flux de la sève a été alors déterminée par observation visuelle d'une coloration bleue dans les

vaisseaux des plantes à partir des sections longitudinales et transversales du tissu végétal frais sous la loupe binoculaire ou sous microscope photoniques (Bani et al., 2012).

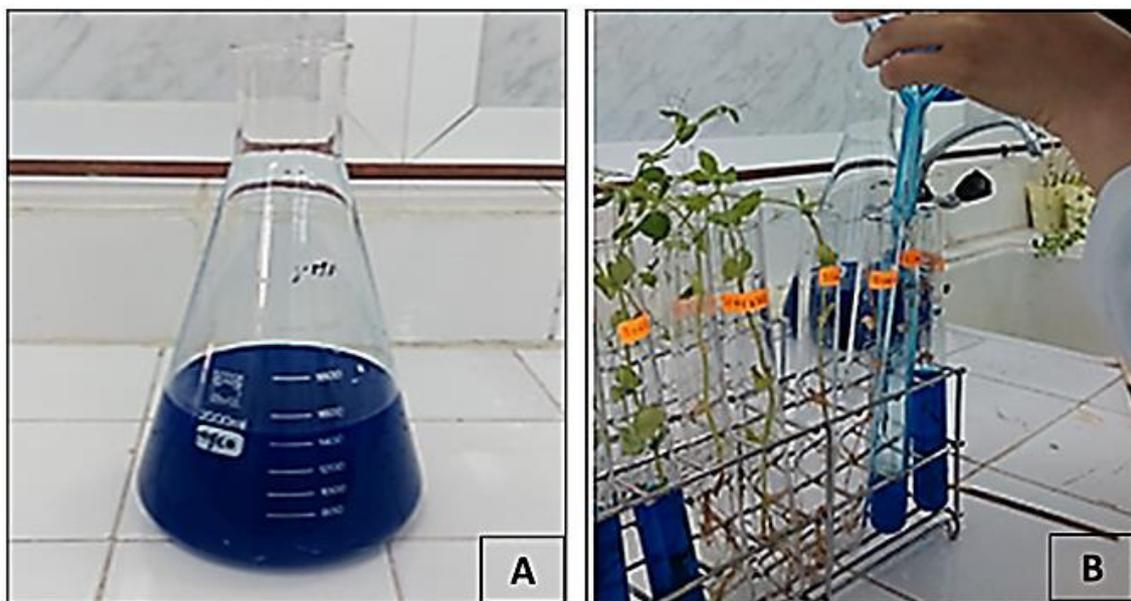


Figure 11. Essai de continuité de flux de la sève sur des plantes du pois.
(A) Solution de bleu de naphthol et (B) immersion des racines dans la solution.

3. Essai de détection de la présence de *Fop*

3.1. Matériel végétal

Six géotypes de pois ont été utilisés afin de déterminer l'ampleur de leur colonisation par *Fop*. Il s'agit de 2 géotypes sensibles P615 et 2946 et de 4 géotypes résistants P651, P656, Merveille de Kelvedon et New Season (Bani et al., 2012 ; Mekhaldi, 2016). Les semences des 6 géotypes ont été issues de l'Institut de l'Agriculture Durable de Cordoue (*IAS-CSIC, Cordoba, Spain*).

3.2. Ré-isolement de *Fop*

Le pathogène a été ré-isolé à partir de quatre parties (racine, collet, région inférieure et supérieure de la tige) des plantes inoculées par la souche R2F42 de *Fop*. Le ré-isolement a été effectué 7 jours après l'inoculation.

Suivant la méthode décrite par Bani et ses collaborateurs (2012), les plantes sont lavées de la perlite sous l'eau du robinet, superficiellement désinfectées dans une solution 2.5% hypochlorite de sodium-5% éthanol pendant 2 min, puis rincées deux fois avec de l'eau distillées stériles pendant 2 min. les plantes ont été par la suite divisées en quatre parties (racine, collet, région inférieure et supérieure de la tige).

Une section d'environ 1 à 1.5 cm de longueur de chaque partie a été alors déposée sur le milieu PDA contenant la kanamycine (0.1mg/ml) et incubée à 28°C pendant 3 jours. La présence de *Fop* dans les sections des plantes a été détectée par l'observation du développement d'une colonie autour de la section (Figure 12).

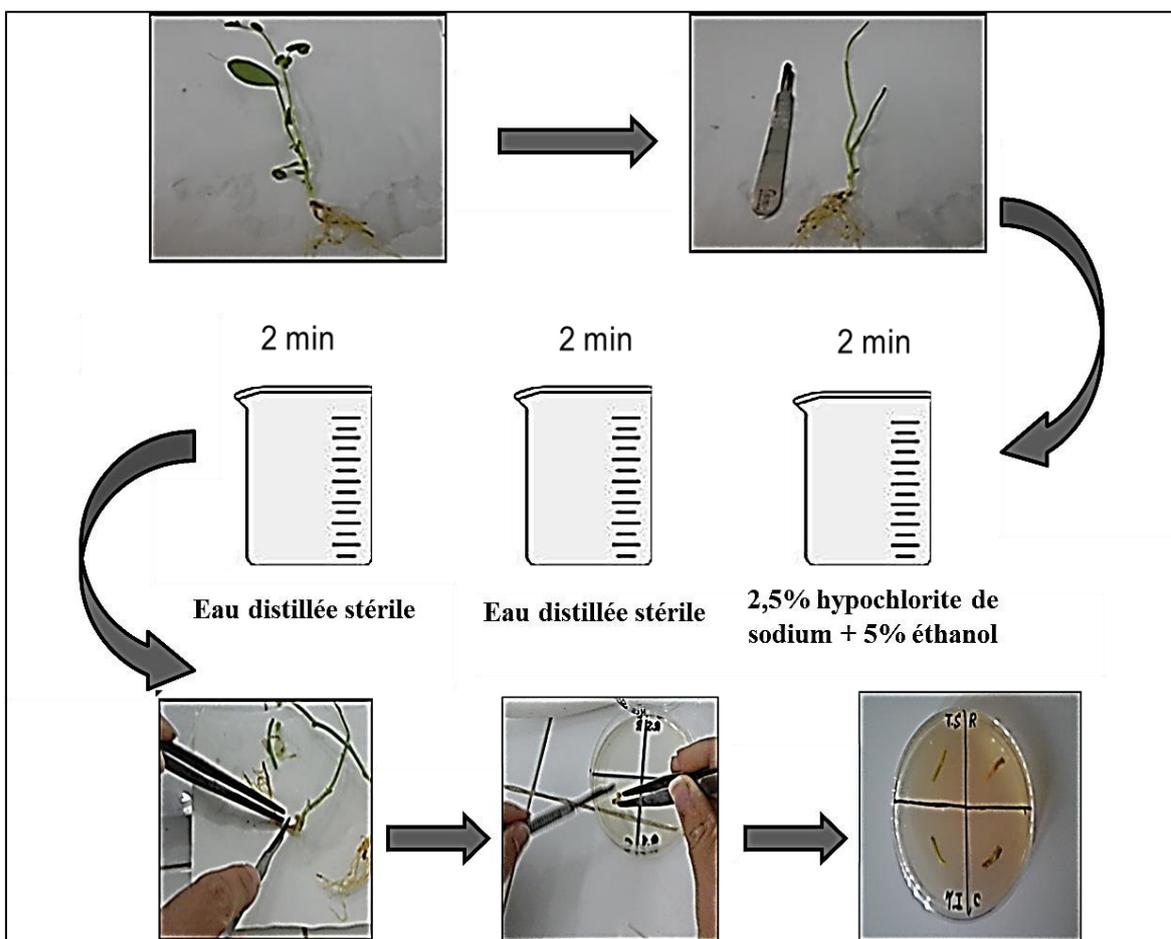


Figure 12. Etapes conçues pour la désinfection superficielle et de ré-isollement de *Fop*.

Chapitre III.

Résultats et discussion

1. Comportement des géotypes du pois vis-à-vis de la fusariose vasculaire

1.1. Description symptomatologique

Les deux souches R1 et R2F42 de *Fop* provoquent les mêmes symptômes sur les géotypes étudiés. Nous avons constaté que la souche R2F42 est plus virulente que la souche R1, en causant des symptômes plus intenses sur les géotypes affectés.

1.1.1. Symptômes sur la partie aérienne

Les premiers symptômes sur les plantes sensibles sont apparus environ 10 à 15 jours après l'inoculation. Les symptômes de la maladie ont été observés sur les feuilles basales et atteignent progressivement les jeunes feuilles jusqu'au dessèchement complet et la mort de la plante (Figures 13, 14).

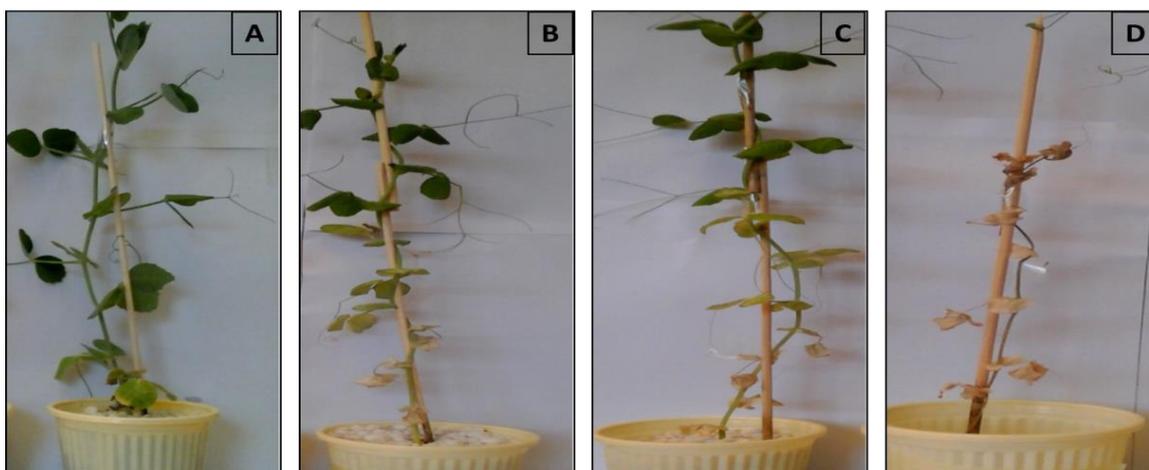


Figure 13. Progression des symptômes de la fusariose vasculaires chez le géotype 3106 inoculé avec la souche R1 de *Fop*.

(A) 7 jours, (B) 13 jours, (C) 19 jours et (D) 27 jours après l'inoculation.



Figure 14. Progression des symptômes de la fusariose vasculaires chez le génotype 3044 inoculé avec la souche R2F42 de *Fop*.

(A) 7 jours, (B) 13 jours, (C) 19 jours et (D) 27 jours après l'inoculation.

Au niveau des feuilles, le jaunissement progresse des feuilles inférieures vers l'apex de la tige. L'initiation des symptômes commence aux extrémités du limbe qui deviennent vert jaunâtre et/ou se courbent vers le bas. Le jaunissement progresse à travers la feuille en s'associant avec une nécrose jusqu'à ce que la feuille entière flétrisse et se dessèche (Figure 15). Les tiges deviennent plus fragiles avec une coloration jaune à orange.



Figure 15. Evolution des symptômes de la fusariose vasculaires sur les feuilles.

1.1.2. Symptômes racinaires

Les racines de la plupart des génotypes inoculés avec la souche R2F42 ont montré une décoloration rouge foncée à brun. Les génotypes qui sont avérés susceptibles ou partiellement résistants, ont montré une décoloration plus intense par rapport aux génotypes résistants et par rapport aux témoins. Par contre, les racines des plantes inoculées avec la souche R1 n'ont pas montré cette décoloration (Figure 16).



Figure 16. Aspect des racines des plantes 30 jours après l'inoculation.

(A) Génotype 2329 et (B) génotype 3068.

1.1.3. Symptômes internes

Des coupes longitudinales de la racine et du collet des différents génotypes ont été réalisées 30 jour après leurs inoculation avec les deux souches R1 et R2F42 de *Fop*. L'observation de ces coupes sous une loupe binoculaire (G : $\times 8$) a révélé la présence d'une décoloration rouge foncé du système vasculaire et/ou du tissu parenchymateux des génotypes susceptibles inoculés avec la souche R2F42. Par contre, les plantes inoculées avec la souche R1 n'ont pas montré cette décoloration (Figure 17).



Figure 17. Symptômes internes dus aux deux souches de *Fop* (R1 et R2F42) 30 jours après l'inoculation (G : ×8).

1.2. Taux d'infection

Le taux d'infection des génotypes étudiés était estimé en dénombrant le nombre de feuilles porteuses de symptômes de la fusariose vasculaire, par rapport au nombre total des feuilles. Le taux d'infection des 18 génotypes varie de 25 à 100%. Sur cette base, nous avons pu sélectionner les génotypes résistants, partiellement résistants et sensibles selon leur réponse aux deux souches de *Fop*.

L'analyse de la variance des valeurs des taux d'infection a mis en évidence des différences très hautement significatives ($p=0,000$) entre les réponses des 18 génotypes étudiés en interaction avec les deux souches R1 et R2F42 de *Fop* (Annexe 2).

D'après le calcul des moyennes du taux d'infection, nous avons pu classer les génotypes étudiés en trois catégories : résistants, partiellement résistants et sensibles. En interaction avec la souche R1, les deux génotypes P648 et Merveille sont résistants en enregistrant des valeurs du taux d'infection ne dépassant pas 50%. La résistance partielle a été signalée chez les génotypes 2995, 3034, 2367, 2905, 3068, 2714, 2372, 2329, 3044 et P26, en enregistrant des taux d'infection compris entre 55,76% et 65,49%. Les génotypes 2946, P21, 3030, 2998, 3106 et 26 ont été les plus sensibles avec des taux d'infection qui dépassent 70% (Figure 18.A).

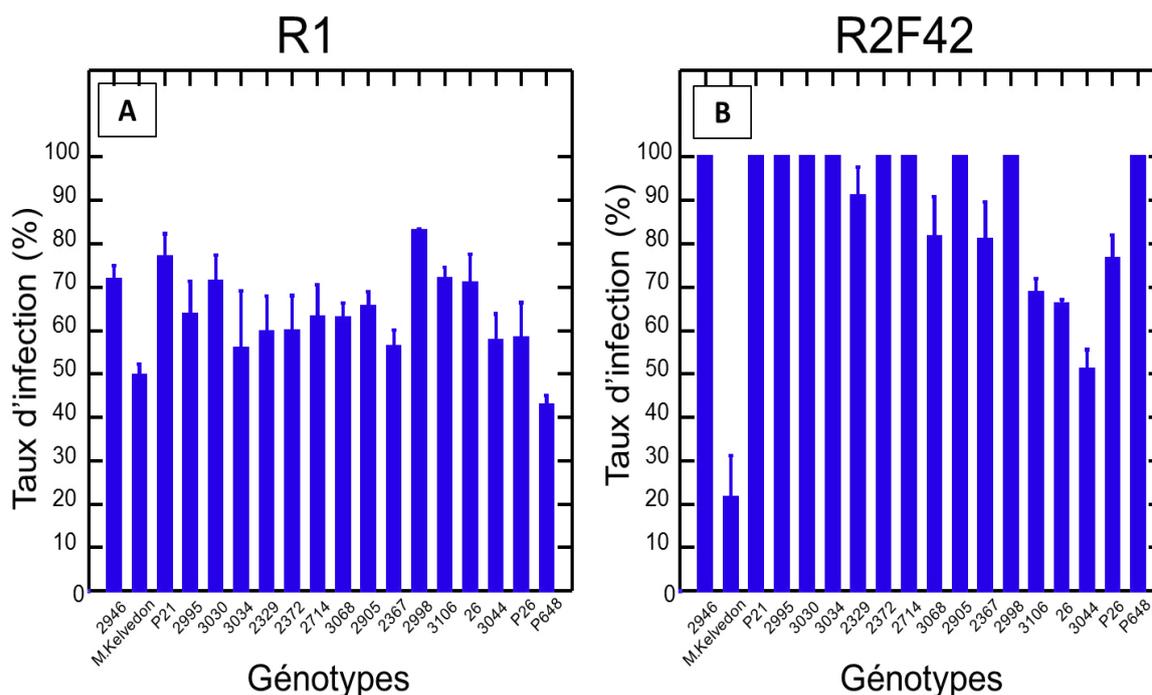


Figure 18. Taux d'infection des 18 géotypes étudiés 30 jours après l'inoculation avec les deux souches de *Fop* (R1 et R2F42).

En interaction avec la souche R2F42, la plupart des géotypes étudiés étaient sensibles. Un taux d'infection de 100% (mort de la plante) a été enregistré chez les géotypes 2946, P21, 2995, 3030, 3034, 2372, 2714, 2905, 2998 et P648 dont ils sont avérés très sensibles à cette souche. Les géotypes 2329, 3068, 2367 et P26 ont été aussi sensibles avec des taux d'infection variant entre 76,56% et 91,11%. Le géotype 3044 a été partiellement résistant avec une moyenne de taux d'infection de 50, 92%, tandis que le géotype contrôle Merveille de Kelvedon a été le plus résistant en enregistrant une moyenne de taux d'infection de 21,42% (Figure 18.B).

La progression de la maladie a été également estimée dans le temps où nous avons observé que l'évolution des symptômes était plus rapide chez les géotypes inoculés avec la souche R2F42 par rapport à ceux inoculés avec la souche R1.

L'apparition des premiers symptômes a été observée à partir du 7^{ème} ou 10^{ème} jour après l'inoculation avec la souche R2F42, sur la plupart des génotypes étudiés. La seule exception est le génotype Merveille de Kelvedon qui a montré un temps de latence bien plus long puisque les symptômes n'ont commencé à être visibles sur ce génotype qu'à partir du 22^{ème} jour après l'inoculation (Figure 19.B).

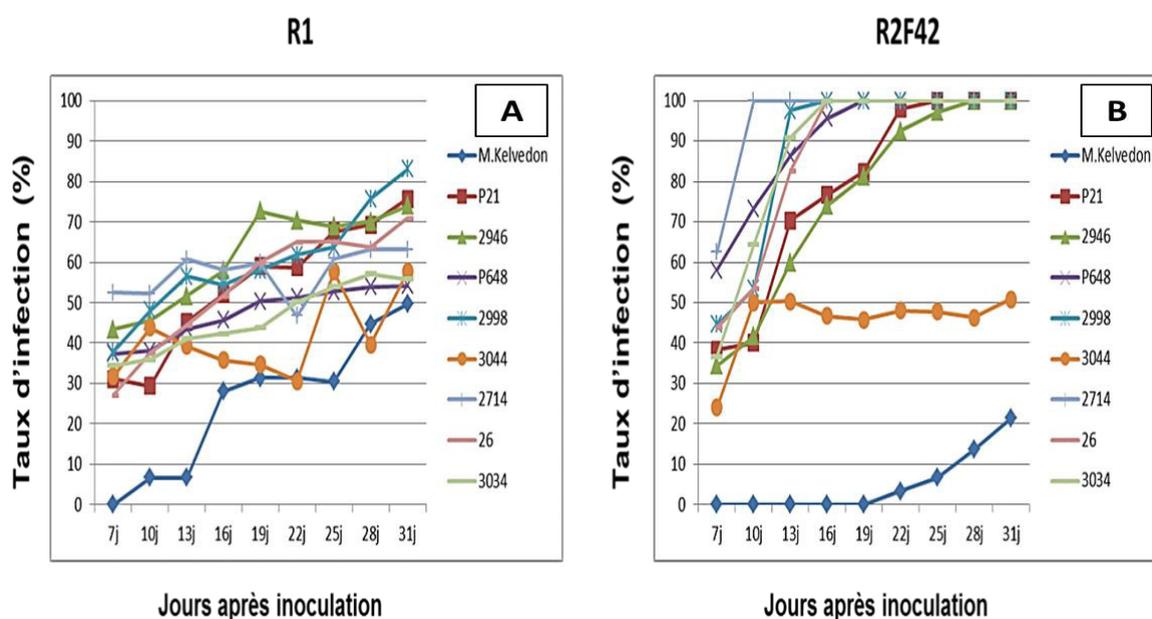


Figure 19. Evolution des valeurs de taux d'infection chez quelques génotypes étudiés.

En interaction avec la souche R1, les génotypes qui sont avérés les plus susceptibles (2946, 26, P21, 2998), ont montré les premiers symptômes à partir du 7^{ème} jour pour atteindre des valeurs avoisinant 50%, 16 jours après l'inoculation (Figure 19.A). Les génotypes les plus résistants (Merveille de Kelvedon et P648) ont enregistré une cinétique très lente avec des valeurs avoisinant 50% après 30 jours de leur inoculation (Figure 18.A).

En comparant les valeurs minimales et maximales de taux d'infection correspondant aux deux souches de *Fop* utilisées, nous avons pu déduire que les valeurs les plus importantes ont été enregistrées chez les génotypes inoculés avec la souche R2F42. La race 1 représentée par la souche R1 est moins virulente que la souche R2F42 (Figure 20). L'ANOVA a mis en évidence une différence très hautement significative entre ces deux souches (Annexe 2).

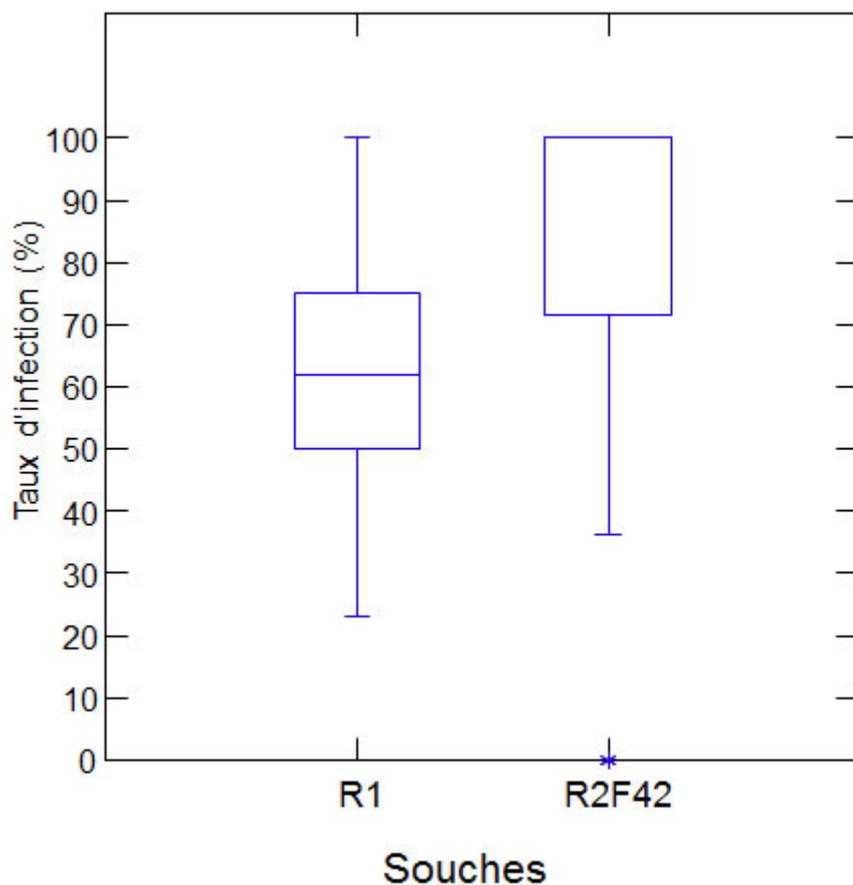


Figure 20. Valeurs minimales et maximales de taux d'infection de deux souches R1 et R2F42 de *Fop*.

2. Traçage de la continuité de la sève

Le colorant du bleu de naphtol a été utilisé comme traceur pour étudier la continuité de l'eau et le flux d'éléments nutritifs chez les génotypes du pois, 30 jours après leur inoculation avec la souche R2F42 de *Fop*.

La coloration des tissus vasculaires a été enregistrée chez le génotype résistant Merveille de Kelvedon au niveau des racines, des tiges et même des feuilles, dont la circulation de la sève a été normale. Tandis que chez les génotypes sensibles (2946, P21 et P648) et les génotypes partiellement résistants(2329,3068,2367), la coloration bleu n'a été observée qu'au niveau des racines.

Au niveau des feuilles, les tissus et nervures sont devenus bleus (Figure 21). Les coupes transversales et longitudinales des tiges et des racines des plantes sont aussi démontré la présence d'une coloration bleue au niveau des cellules du système vasculaire (Figure 22). Cependant, l'intensité et le prolongement de la coloration dans les tissus végétaux ont varié selon le génotype testé, dont la coloration bleue était beaucoup plus intense dans le génotype résistant Merveille de Kelvedon par rapport aux génotypes sensibles 3044, 26, 3106, P26 et 2367.

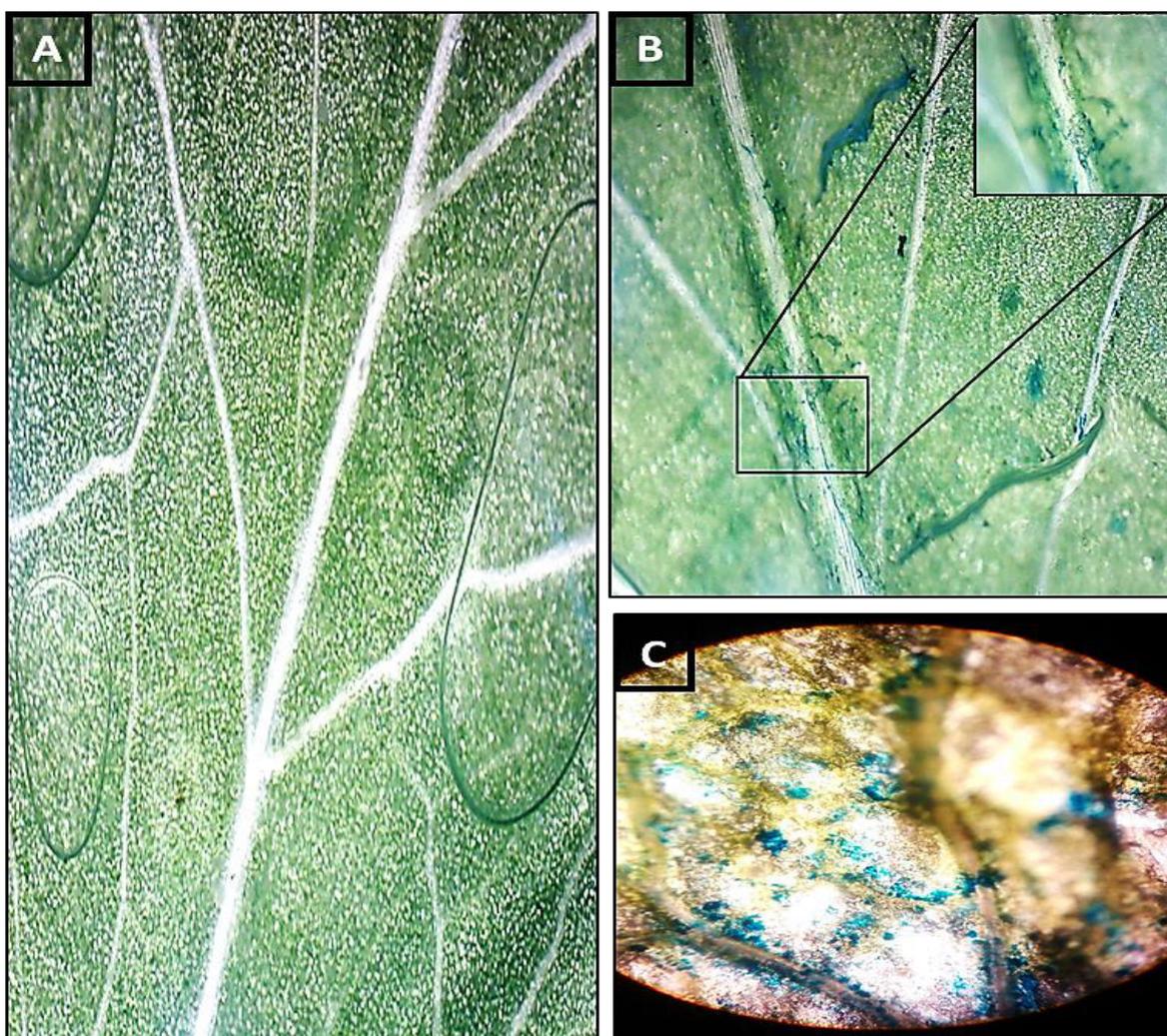


Figure 21. Observation microscopiques de la coloration par le bleu de naphtol au niveau des feuilles du génotype Merveille de Kelvedon inoculé avec la souche R2F42 (G : $\times 10$).

(A) Feuille sans coloration, (B) feuille avec des nervures colorées et (C) feuille avec des nervures et tissus colorés.

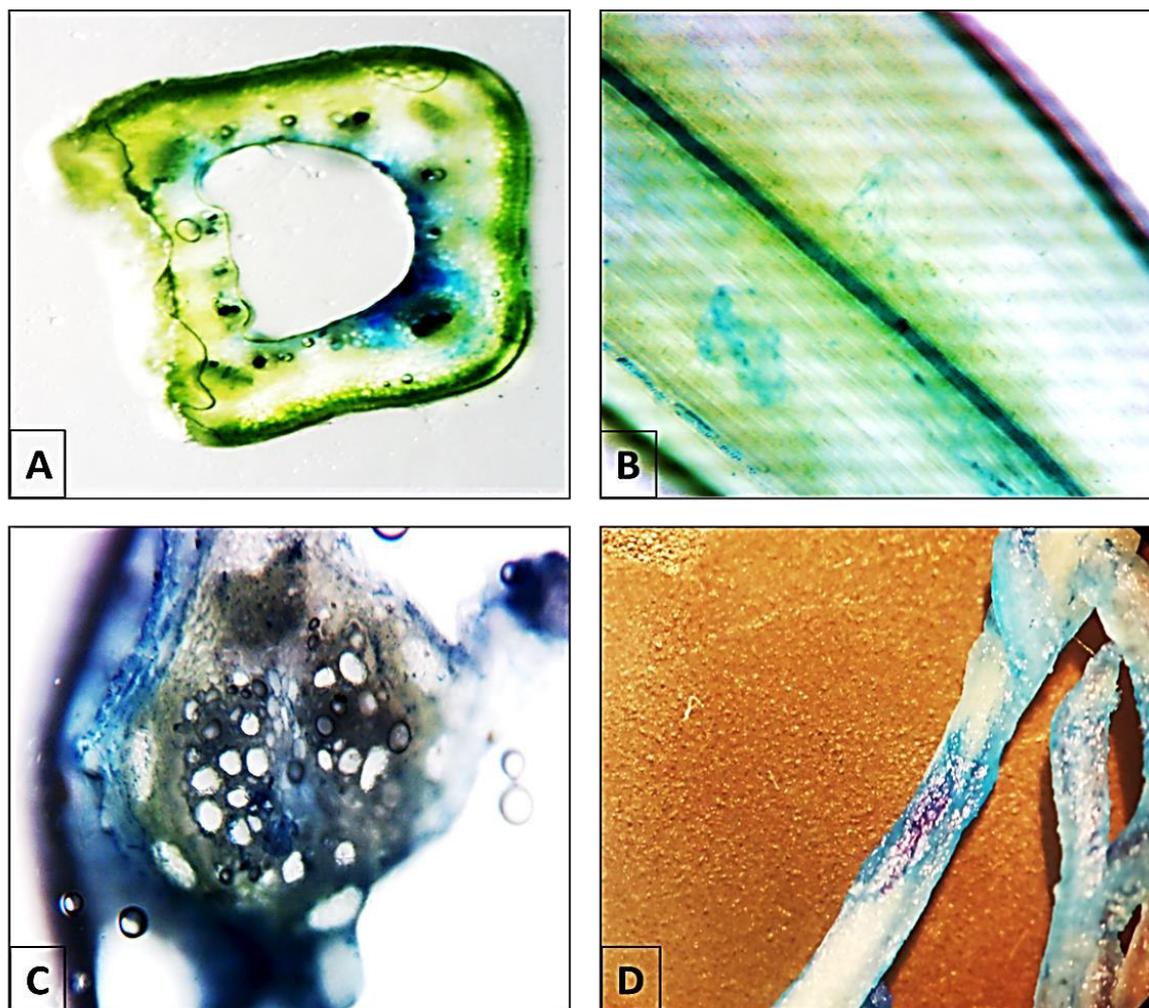


Figure 22. Observation microscopiques de la coloration par le bleu de naphtol au niveau des tiges et des racines.

(A) Coupe transversale de la tige (G : $\times 32$), (B) coupe longitudinale de la tige (G : $\times 100$), (C) coupe transversale de la racine (G : $\times 100$) et (D) coupe longitudinale de la racine (G : $\times 8$).

3. Détection de la présence de *Fop*

Pour déterminer l'ampleur de la colonisation du champignon, les plantes des génotypes ont été récupérées 7 jours après leur inoculation avec la souche R2F42 pour ré-isoler le pathogène.

Trois jours après l'incubation des sections, nous avons observé le développement d'un réseau mycélien autour des fragments des plantes inoculées. Les colonies fongiques ont été sous forme de filaments blanchâtres émergeant du tissu végétal (Figure 23).

Chez les génotypes sensibles P615 et 2946, les colonies de *Fop* se sont développées autour des sections des différentes parties de la plante. En revanche, chez les génotypes résistants Merveille de Kelvedon, New season, P651 et P656, les colonies de *Fop* ont été développées uniquement autour des sections des racines et du collet (Figure 23).

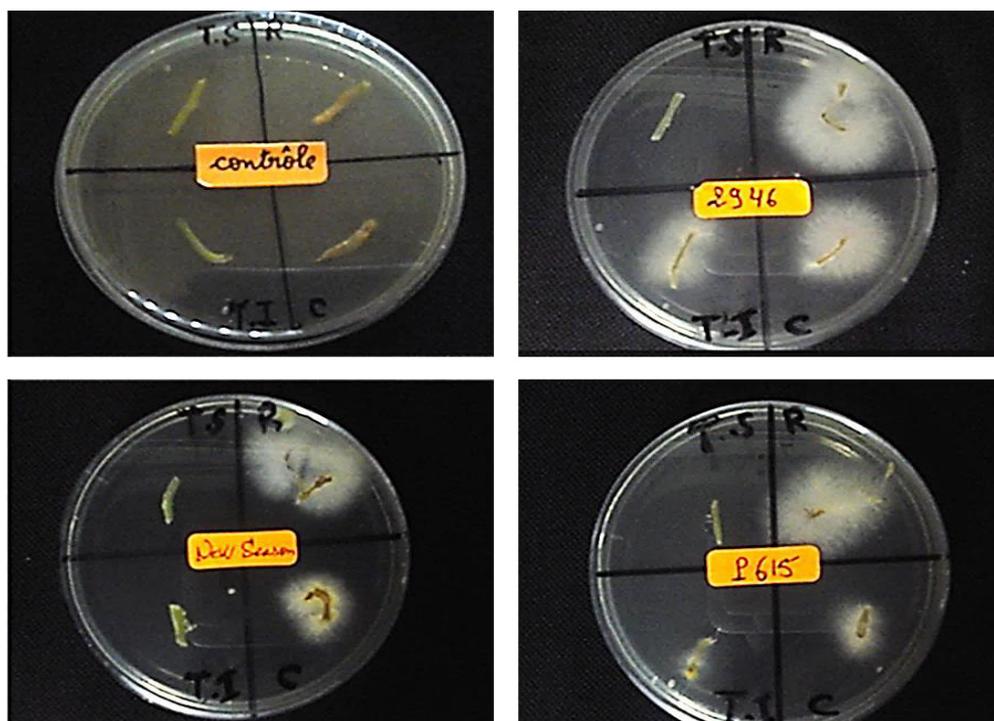


Figure 23. Développement des colonies de *Fop* autour de la section des plantes inoculées.

(R) racine, (C) collet, (TI) partie inférieure de la tige et (TS) partie supérieure de la tige.

4. Discussion Générale

Notre travail avait pour objectif d'étudier l'interaction de *Pisum* spp. avec l'agent causal de la fusariose vasculaire *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. La première partie du travail a été consacré à l'étude de comportement d'une collection de 18 génotypes de *Pisum* spp. vis-à-vis de deux souches pathogènes de *Fop* (R1 : race 1, R2F42 : race 2), dans des conditions semi-contrôlées sous serre. Ces deux souches ont pu induire des symptômes typiques de la fusariose vasculaire et les 18 génotypes ont présenté différents comportements.

La fusariose vasculaire provoque une série de symptômes externes, incluant l'éclaircissement des nervures, l'enroulement des feuilles, le flétrissement, le jaunissement, les nécroses puis la mort de la plante (MacHardy et Beckman, 1983). Ces symptômes peuvent être le résultat d'un déficit hydrique dû à l'occlusion des vaisseaux (MacHardy et Beckman, 1983) ou de la combinaison des activités du pathogène, telles que la condensation du mycélium dans les cellules du xylème et/ou la production de toxines (Charchar et Kraft, 1989).

Dans l'interaction des 18 génotypes de *Pisum* spp. étudiés avec les deux souches de *Fop*, des symptômes typiques de la fusariose vasculaire ont été signalés chez les génotypes sensibles. La réponse de chaque génotype a été très variable. Généralement, les symptômes de flétrissement progressent beaucoup plus rapidement chez les génotypes sensibles tels que 2946, P21, 2998 et 3030 que chez les génotypes résistants tels que Merveille de Kelvedon.

Concernant les symptômes externes, l'infection du pois par *Fop* est généralement associée avec une décoloration des tissus vasculaires qui deviennent rouge-orange ou noirs. Chez les plantes sensibles, cette décoloration vasculaire progresse de la racine vers la tige et elle est généralement plus intense en réponse à la race 2 du champignon (Kraft et Pfleger, 2001). D'après les observations des coupes racinaires, le tissu vasculaire de la plupart des génotypes inoculés par la souche R2F42, a viré vers une coloration rouge foncée. Par contre, cette décoloration a été absente chez les génotypes inoculés par la souche R1. Un noircissement des cellules corticales et épidermiques a été également observé au niveau du collet de certains génotypes tels que P21, P26, 3106, 3044 et 2329.

La plupart des travaux sur la résistance du pois à la fusariose vasculaire prennent en considération le taux d'infection et la sévérité des symptômes en tant que paramètres distinctifs (Neumann et Xue, 2003 ; Lebeda *et al.*, 2010 ; Bani *et al.*, 2012, Mekhaldi, 2016) . Ainsi, nous avons utilisé le calcul du taux d'infection pour différencier les génotypes de *Pisum* spp. dont il nous a permis d'identifier trois catégories de réactions : résistance, résistance partielle et susceptibilité.

Les génotypes présentant une valeur de taux d'infection inférieure à 50% sont considérés comme résistants. Selon ces valeurs, et en interaction avec la souche R1, les génotypes 2946, P21, 3030, 2998, 3106 et 26 ont été les plus sensibles, avec des taux d'infection supérieurs à 70 %. Alors que les génotypes 2946, P26, 2995, 3030, 3034, 2329, 2372, 2714, 3068, 2905, 2367, 2998, P26 et P648 sont les plus sensibles en interaction avec la souche R2F42.

La deuxième partie du travail a été consacrée à la détermination de la continuité de la sève chez les génotypes inoculés en utilisant un colorant traceur (bleu de naphтол). L'observation microscopique des coupes transversale et longitudinales des tiges et racines des différents génotypes inoculés avec la souche R2F42, nous a permis de constater une différence d'intensité de la coloration et de son prolongement dans les tissus végétaux selon le génotype testé. Les génotypes sensibles tels que P26, 2367 et 3068 ont présenté une coloration bleu clair par rapport au génotype résistant Merveille de Kelvedon.

Le blocage de la circulation normale de la sève chez les génotypes sensibles peut être dû à l'obstruction du système vasculaire et des cellules du xylème (Tessier *et al.*, 1990). Ainsi, la formation de telle obstruction a été supposée pour être la conséquence d'une réaction défensive retardée survenant dans la tige des plantes sensibles (Tessier *et al.*, 1990). De plus, la production de la gomme par la plante par l'action d'une pectinase fongique a également été suggéré pour être l'origine de ces occlusions vasculaires (Pegg, 1985 ; Beckman, 1987).

Les amas mycéliens de *Fop* dans les cellules du xylème sont la cause principale du flétrissement des plantes et de leur mort subséquente suite à un stress hydrique (Pegg, 1985 ; Beckman, 1987 ; Webster et Weber 2007).

D'autre part, et pour déterminer l'ampleur de la colonisation du champignon au niveau des différentes parties des génotypes inoculée par R2F42, le ré-isolément de *Fop* a révélé un développement d'un réseau mycélien autour des fragments des plantes inoculées.

Chez les génotypes sensibles testés, les colonies de *Fop* se sont développées autour des fragments des différentes parties de la plante (racine, collet et parties inférieure et supérieure de la tige). En outre, dans les génotypes résistants Meville de Kelvedon, New season, P651 et P656, les colonies de *Fop* se sont développées uniquement autour des fragments des racines et du collet.

Les résultats montrent que la colonisation fongique du système vasculaire est souvent rapide. Cette colonisation facilite souvent la production de microconidies dans les vaisseaux du xylème. En effet, ces microconidies ont été démontrées pour être transportées vers le haut *via* le flux de la sève jusqu'à ce qu'elles atteignent les différentes parties de la plante (Beckman *et al.*, 1961 ; Beckman *et al.*, 1962 ; Bishop et Cooper, 1983).

Conclusion

La fusariose vasculaire du pois, causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, a été signalée dans tous les pays où le pois est cultivé. La maladie est souvent sévère là où on pratique de courtes rotations avec d'autres cultures. Dans ces conditions, quand le pathogène développe des quantités suffisantes d'inoculum et en présence d'un cultivar sensible, il en résulte des pertes économiques considérables. En raison de l'efficacité réduite du contrôle chimique de cette maladie et de la pollution et risques sanitaires associés à ce type de méthodes de contrôle, l'utilisation de cultivars résistants aux différentes races du pathogène, semble être la mesure la plus appropriée.

Notre travail avait pour objectif d'étudier l'interaction *Pisum* spp.-*Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. La première partie a porté sur l'étude du comportement de 18 génotypes du pois vis-à-vis de deux souches phytopathogènes de *Fop* dans des conditions semi-contrôlées sous serre. Les deux souches de *Fop* (R1 et R2F42) ont pu induire des symptômes typiques de la fusariose vasculaire (flétrissement, jaunissement, dessèchement des feuilles et décolorations des vaisseaux et des racines). Les différents génotypes étudiés ont réagi d'une façon différentielle selon la souche inoculée de *Fop*.

Pour l'évaluation de la maladie, nous avons calculé le taux d'infection représenté par le pourcentage des feuilles symptomatiques par rapport au nombre total des feuilles. En interaction avec la souche R1, les deux génotypes P648 et Merveille sont résistants en enregistrant des valeurs du taux d'infection ne dépassant pas 50%, alors que les génotypes 2946, P21, 3030, 2998, 3106 et 26 ont été les plus sensibles avec des taux d'infection qui dépassent 70%. En interaction avec la souche R2F42, la plupart des génotypes étudiés étaient sensibles en enregistrant des taux d'infection de 100%. Le génotype 3044 a été partiellement résistant avec une moyenne de taux d'infection de 50, 92%, tandis que le génotype contrôle Merveille de Kelvedon a été le plus résistant en

enregistrant une moyenne de taux d'infection de 21,42%. La souche R2F42 a été plus virulente que la souche R1, en enregistrant les valeurs de taux d'infection les plus élevés.

D'autre part, et afin de déterminer la continuité de l'eau et des éléments nutritifs chez les génotypes du pois, un traçage par le bleu de naphtol a été effectué sur des plantes inoculées par la souche R2F42. Les résultats obtenus démontrent la présence du colorant au niveau des racines et des tiges de tous les génotypes (résistants ou sensibles), alors que sa présence au niveau des feuilles a été restreinte aux génotypes résistants. Nous avons constaté donc que chez les génotypes sensibles, il y avait un blocage de la circulation de la sève par le champignon.

La troisième partie du travail a été consacré à l'étude de l'ampleur de la colonisation du pathogène. Le ré-isolément de *Fop* à partir des fragments des plantes inoculées avec la souche R2F42, a révélé sa présence au niveau des différentes parties de la plante chez les génotypes sensibles, tandis que chez les génotypes résistants, l'apparition des colonies du pathogène a été limitée au niveau de la racine et du collet. Ces résultats peuvent mettre en évidence des mécanismes de résistance situés à la base de la tige et la racine des plantes résistantes. La susceptibilité peut être le résultat d'une résistance insuffisante et retardée de ces mécanismes.

Les différents génotypes de *Pisum* spp. étudiés qui ont montré des niveaux importants de résistance envers *Fop*, peuvent être utilisés dans les programmes d'amélioration de la résistance chez le pois. Les mécanismes de résistance à la fusariose vasculaire doivent d'avantage être étudiés au niveau cellulaire, tissulaire et même moléculaire.

Références Bibliographiques

- **Abouzeid, M.A., Boari, A., Zonno, M.C., Vurro, M. and Evidente, A., 2004.** Toxicity profiles of potential biocontrol agents of *Orobanche ramosa*. *Weed Science* 52, 326-332.
- **Agrios, G.N., 2005.** Plant pathology, 5th edition. Department of plant pathology. University of Florida; Elsevier Academic Press. pp. 948.
- **Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, B. and Steinberg, C., 2009.** Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist*, 184 :529-44.
- **Armstrong, G. M. and Armstrong, J. K., 1981.** Formae specialis and races in *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. Pages 391-399 In: *Fusarium Diseases. Biology and Taxonomy*. Nelson P. E., Tousson T. A. and Cook R. J. eds Pennsylvania State University Park., 457pp.
- **Arroyo-Garcia R., Cenis, J.L., Tello J., Martinez-Zapater, J.M and Cifuentes, D., 2003.** Genetic relationships among seven specialized forms and AFLPs. *Spanish Journal of Agricultural Research.*, 3:55-63.
- **Bani, M., Rubiales, D. and Rispaill, N., 2012.** A detailed evaluation method to identify sources of quantitative resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* race 2 within a *Pisum* spp. germplasm collection. *Plant Pathology* 61, 532 - 542.
- **Bani, M., 2015.** Multidisciplinary approaches including histological, biochemical and molecular tools to study the resistance mechanisms to fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* in pea (*Pisum sativum*). PhD thesis. Department of genetics. University of Cordoba. Spain. 187p.
- **Barik, B.P., Tayung, K., Jagadev, P.N. and Dutta, S.K., 2010.** Phylogenetic Placement of an Endophytic Fungus *Fusarium oxysporum* Isolated from *Acorus calamus* Rhizomes with Antimicrobial Activity. *E.J.B.S.*, 2.

- **Bastianelli, D., Grosjean, F., Peyronnet, C., Duparque, M. and Régnier, J. M., 1998.** Feeding value of pea (*Pisum sativum* L.) 1. Chemical composition of different categories of pea, *Animal Science*, 67(3), pp.609 - 619.
- **Beckman, C.H and Roberts, E.M., 1995.** On the nature and genetic basis for resistance and tolerance of fungal wilt diseases, *Advences in Botanical Research*, 21, pp.35 - 77.
- **Beckman, C.H., 1987.** *The Nature of Wilt Diseases of Plants.* Am. Phytopath. Soc. Saint-Paul, Minnesota, USA, p 175.
- **Beckman, C.H., Halmos, S. and Mace, M.E., 1962.** The interaction of host, pathogen, and soil temperature in relation to susceptibility to *Fusarium* wilt of bananas. *Phytopathology*, 52: 134-140.
- **Beckman, C.H., Mace, M.E., Halmos, S. and McGahan, M.W., 1961.** Physical barriers associated with resistance in *Fusarium* Wilt of bananas. *Phytopathology*, 52: 134-140.
- **Beckman, C.H., Verdier, P.A and Mueller, W.C., 1989.** A system of defense in depth provided by vascular parenchyma cells of tomato in response to vascular infection with *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, race 1 , *Physiological and Molecular Plant Pathology* ,pp. 227 - 239.
- **Benachour, K., 2008.** Diversité et activité pollinisatrice des abeilles (*Hymenoptera: Apoidea*) sur les plantes cultivées, p 33.
- **Benchabane, M ., Bakour, R ., Toua, D. et Boutekrabt , A., 2000.** Mise en évidence de l'effet antagoniste de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate. *Bulletin OEPPL/EPPO*, 30, 243-246.
- **Biederbeck, V.O., Zenter, R.P and Campbell, C.A., 2005.** Soil microbial populations and activities as influenced by legume green fallow in a semiarid climate. *Soil Biol. Biochem.* 37: pp.1775-1784.
- **Bishop, C.D. and Cooper, R.M., 1983.** An ultrastructural study of vascular colonization in three vascular wilt diseases: I. Colonization of susceptible cultivars. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 23: 323-343.
- **Black, L ., Sylvia ,K. L., Green. G. L., Hartman, and Jean-Poulos ,M ., 1993.** *Maladies du poivron, Un guide pratique.* Department of plant pathology and crop physiology. Louisiana State University Agricultural

- Center Baton Rouge LA 70803 USA. Centre Asiatique de recherche et de développement de légumes ; centre technique de coopération agricole et rurale ACP-CEE, p 14 -88.
- **Booth, C., 1971.**The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England., 237 p.
 - **Boyeldieu, J., 1991.** Produire des grains oléagineux et protéagineux. Paris, Lavoisier Tec et Doc.
 - **Brink, M. et Belay, G., 2006.** Ressources végétales de l'Afrique tropicale 1. Céréales et légumes secs. Fondation PROTA, Pays-Bas, pp. 171 – 177.
 - **Burgess, I.W. et al .,1994.**laboratory Manual for fusarium research 3^{red} , Departement of corp sciences. University of syndney.
 - **Castillejo ,M.A., Bani, M. and Rubiales, D., 2015.** Understanding pea résistance. Mecanismos in reppnse to *Fusarium oxysporum* through proteonic analysis phytochemistry, p 2.
 - **Chakrabarti, A., 2013.** *Fusarium oxysporum*: A “Moving” View of Pathogenicity. Chapter 7, In: Horwitz B.A. et al. Genomics of soil- and plant associated fungi. Soil Biology 36. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
 - **Charchar, M. and Kraft, J.M., 1989.** Response of near-isogenic pea cultivars to infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. pisi Races 1 and 5. Canadian Journal of Plant Science, 69: 1335-1346.
 - **Claude, R., Guy Boivin, C. T et Paul, V., 1994.** Maladies et Ravageurs des Cultures Légumières au Canada. La Société Canadienne de Phytopathologie. Société d'entomologie du Canada, pp. 223- 232.
 - **Compant, S., 2007** .Interaction entre la vigne, *Vitis vinifera* L., et une bactérie endophytique, *Burkholderia phytofirmans* souche PsJN : colonisation, induction de défenses et résistance systémique contre *Botrytis cinerea*. Thèse. Agro. Doc. Champagne Ardenne, pp.210.
 - **Cousin, R and Bannerot, H., 1992.** Amélioration des espèces végétales cultivées. INRA Editions, Paris, France, pp .173–188.
 - **Cousin, R., 1997.** Peas (*Pisum sativum* L.), Field Crops Research, pp. 111 -130.
 - **Cousin, R ., 1996.** Le pois variabilité, objectifs de sélection. INRA, station de Génétique et d'Amélioration des plantes 78026 Versailles cedex ,6p.

- **Cunnington, J., Lindbeck, K., Rodney, H. and Jones., 2009.** Diagnostic methods for Fusarium wilt of chickpea (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*) Padil. Plant Biosecurity Toolbox page 1-22.
- **Di Pietro, A., Garcia-Maceira, F.I., Meglecz, E. and Roncero, I.G., 2001.** A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis, Mol. Microbiol., 39, 1140 - 1156.
- **Di Pietro, A., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J. and Roncero, M.I., 2003.** *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. Mol. Plant Pathol. 4:315-325.
- **Diener, A.C. and Ausubel, F.M., 2005.** Resistance to *Fusarium oxysporum* 1, a Dominant Arabidopsis Disease-Resistance Gene, Is Not Race Specific, Genetics Society of America, Genetics, pp. 305 - 321.
- **Dixon, R. A and Sumner, L.W., 2003.** Legume natural products: Understanding and manipulating complex pathways for human and animal health, Plant Physiology, 131(3), pp. 878 - 885.
- **Dixon, R.A., 2001.** Natural products and plant disease resistance, Nature, 411, pp. 843-847.
- **Dubreuil, C., 2010.** Mode d'action de l'acide beta –Aminobutyrique chez la Vigne un inducteur de résistance aux pathogènes et étude des mécanismes impliqués dans la sensibilité aux pathogènes du mutant PAD2 d'*arabidopsis* déficient en glutathion. Bourgogne ; Biologie ,p 263.
- **Duniway, J.M., 2002.** Status of chemical alternatives to methyl bromide for pre-plant fumigation of soil. Phytopathology, 92: 1337-1343.
- **El Modafar, C., El Boustani, E., 2002.** Contribution des polyphénols aux mécanismes de défense biologique des plantes, In: Regnault-Roger, C., Philogène, B., Vincent, C. (eds) Biopesticides d'origine végétale, Lavoisier Tech. and Doc., pp. 169 - 185.
- **Elzebroek, T and Wind, K., 2008.** Guide to cultivated plants. CAB International, Oxfordshire, UK. Enzymology. New York: Academic Press, pp.149-158.
- **FAOSTAT., 2004.** <http://apps1.fao.org/faostat>.
- **FAOSTAT., 2013.** <http://faostat.fao.org>.

- **Fourie, G., Steenkamp, E.T., Ploetz, R.C., Gordon, T.R. and Viljoen, A., 2011.** Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infection, Genetics and Evolution*. 11: 533-542.
- **Fourmont, R., 1956.** Les variétés de pois (*Pisum sativum*) cultivées en France, INRA, Paris, + 70 planches, p 253.
- **Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J.M. and Rodriguez-Palenzuela, P., 1998.** Plant defense peptides, *Biopolymers* , Peptide Science ,pp. 479-491.
- **Gordon, T.R. and Martyn R.D., 1997.** The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 35: 111-128.
- **Goth, R.W. and Webb R.E., 1981.** Sources and genetics of host resistance in vegetable crops. In: *Fungal Wilt Diseases of Plants* (ME Mace, AA Bell, CH Beckman, eds) Academic Press. New York, USA , pp 377-411.
- **Govorov, L.I., 1937** .Goroch (Peas). *Kulturnaja Flora SSR* (in Russian). Moscow: State Printing Office, pp. 229–336.
- **Grajal-Martin, M.J., Muehlbauer, F.J., 2002.** Genomic location of the *Fw* gene for resistance to fusarium wilt race 1 in peas. *Journal of Heredity* 93, 291-293.
- **Guimaraes, E.P., Ruane, J., Scherf, B.D., Sonnino, A and Dargie, J. D., 2007.** Marker-Assisted Selection, Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. FAO, Rome, 494p.
- **Haglund, W.A., 1984.** Fusarium wilts. In: *Compendium of Pea Diseases* (DJ Hagedorn, ed). Am. Phytopath. Soc., Saint-Paul, MN, USA. pp 22-24.
- **Haglund, W.A., 1989.** A rapid method for inoculating pea seedlings with *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Plant Disease*. 73: 457-8.
- **Haglund, W.A. and Kraft, J.M., 1979.** *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 6: Occurrence and distribution. *Phytopathology*. 69: 818-820.
- **Haglund, W.A and Kraft, J.M., 1970.** *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 5. *Phytopathology* . 60: 1861-1862.
- **Infantino, A., Kharrat, M., Riccioni, L., Coyne, C.J., McPhee, K.E. and Grunwald, N.J., 2006.** Screening Techniques and Sources of Resistance to Root Diseases in Cool Season Food Legumes. *Euphytica*, 147: 201-221.

- **Irzykowska, L., Bocianowski, J., Waskiewicz, A., Weber, Z., Karolewski, Z., Golinski, P., Kostecki, M. and Irzykowski, W., 2012.** Genetic variation of *Fusarium oxysporum* isolates forming fumonisin B-1 and moniliformin. *Journal of Applied Genetics* 53, 237-247.
- **Jean, M. C., 1994.** Les cultures maraîchères. Maisonneuve et Larose. ACCT. CTA. Larousse Agricole.191.Librairie Larousse .France.
- **Jones, D.A. and Takemoto, D., 2004.** Plant innate immunity - direct and indirect recognition of general and specific pathogen associated molecules, *Curr. Opin. Immunol* , pp. 48-62.
- **Jones, F.R. and Linford M.B., 1925.** Pea Disease Survey in Wisconsin. *Wisc. Agric. Exp. Sta. Res. Bull. WI, USA.* 64, 3 p.
- **Keiko, Y. and Nagisa, M., 2005.** Control of Fusarium Wilt of Pea and Occurrence conditions. *Research Bulletin of the Aichi-ken Agricultural Research Center*, 37:105-110.
- **Khetarpal, R.K., Maury, Y., Cousin, R., Burghofer, A. and Varma, A., 1990.** Studies on resistance of pea to pea seed borne mosaic virus pathotypes , *Ann. Appl. Biol.*, 116, 297-304.
- **Kraft J.M., 1994.** Fusarium wilt of peas (a review). *Agronomie.* 14: 561-567.
- **Kraft, J.M and Pfleger, F.L., 2001.** Compendium of Pea Diseases, APS Press, St. Paul,Minnesota, USA. 67p.
- **Lamb, C and Dixon, R.A., 1997.** The oxidative burst in plant disease resistance, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, pp. 251 - 275.
- **Laumont, P., Chevassus, A., 1960.** Note sur l'amélioration du pois rond en Algérie. École nationale d'agriculture d'Alger.
- **Lebeda, A., Švabova, L. and Dostalova, R., 2010.** Screening of peas for resistance to Fusarium wilt and root rot (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*) In: *Mass Screening Techniques for Selecting Crops Resistant to Diseases.* FAO/IAEA, Vienna, pp.189-196.
- **Leslie, J.F. et al. 2007:** Inter- and intra-specific genetic variation *in Fusarium.* *Intern. J. Food Microbiol.*, 119, 11.
- **Leslie, J. F., Zeller, K.A. and Summerell, B. A., 2001.** Icebergs and species inpopulations of *Fusarium.* *Physiol. Molec. Plant Pathol.*, 59, 107.

- **Leslie, J.F and Summerll. A., 2006.**The *Fusarium* laboratory Manuel. Blackwell Publishing, USA, 387 p.
- **Linford, M.B., 1928.** A Fusarium Wilt of Peas in Wisconsin. Wisc . Agric. Exp. Sta. Res. Bull. WI, USA. 85, 43 p.
- **MacHardy, W.E. and Beckman, C.H., 1983.** Vascular wilt Fusaria: Infection and Pathogenesis In: Nelson, P.E., Tousson, T.A. and Cook, R.J.(eds) *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. The Pennsylvania State University Press, UK, pp. 365-390.
- **MADR., 2009.** Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, Direction des statistiques.
- **Mansfield, J.W., 1983.** Antimicrobial compounds. In Biochemical Plant Pathology, J.A. Callow, (Eds. Chichester, UK: John Wiley Sons), pp.237-265.
- **McPhee, K.E., Tullu, A., Kraft, J.M. and Muehlbauer F.J., 1999.** Resistance to fusarium wilt race 2 in the *Pisum* core collection. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 124: 28-31.
- **Mekhaldi, D., 2016.** Etude du pathosysteme *Pisum sativum-Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. Mém. Magister, Phytopathologie. Université Blida 1. 109 p.
- **Mert-Turk, F., 2002.** Phytoalexins: Defense or just a response to stress?", Journal of Cell and Molecular Biology, pp. 1 - 6.
- **Messiaen, C. M. & Cassini, R., 1968.** Systématique des *Fusarium*. Annales de Phytopathologie 3: 386-454.
- **Michielse, C.B. and Rep, M., 2009.** Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. Mol. Plant Pathol. 10:311-324.
- **Miguel, A. D., Nicolas, R., Elena, P., Diego, R. and Karam, B.S., 2006.** Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. Euphytica , p 147: 1–24.
- **Momma, N ., Momma, M. and Kobara, Y., 2010.** Biological soil disinfection using ethanol: effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and soil microorganisms. Journal of General Plant Pathology 76 :336 - 44.
- **Navas-Cortes, J.A., Hau, B. and Jimenez-Diaz, R.M., 1998.** Effect of sowing date, host cultivar, and race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on development of fusarium wilt of chickpea. Phytopathology 88 :1338–46.

- **Nelson, P.E., Toussoun T.A. and Marasas W.F.O., 1983.** *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park., 193p.
- **Neumann, S. and Xue, A.G., 2003.** Reactions of field pea cultivars to four races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisii*. Can. J. Plant Sci., 83: 377: 379.
- **Nimchuk, Z.T., Eulgem, B.F. and Dangl, J. L., 2003.** Recognition and response in the plant immune system, Annu. Rev. Genet , pp. 579 - 609.
- **Nyabyenda, P., 2005.** Les plantes cultivées en région tropicales d'altitude d'Afrique. Les presses agronomiques de Gembloux, 225 p.
- **Osborn, A.E., 1996.** Saponins and plant defence-A soap story. Trends in Plant Science, 1: 4-9.
- **Pal, K.K. and McSpadden-Gardener, B., 2006.** Biological control of plant pathogens. The plant health instructor. Biological Control, 25p.
- **Pegg, G., 1985.** Life in black hole - The microenvironment of the vascular pathogen. Presidential Address. Transactions of the British Mycological Society, 85: 1-20.
- **Pegg, G.F., 1981.** Biochemistry and physiology of pathogenesis . In Fungal Wilt Diseases of Plants (Eds. Mace, M.E., Bell A.A., Beckman, C.H.), New York : Academic Press, 193-253.
- **Pierre N., 1994.** Les plantes cultivées en régions tropicales d'altitude d'Afrique. Généralités Légumineuses alimentaires plantes à tubercules et racines céréales, pp. 63.
- **Pitrat, M et Foury, C., 2003.** Histoires de légumes des origines à l'orée du XXIe siècle. INRA EDITIONS, p 410.
- **Pouvreau, A., 2004.** Les insectes pollinisateurs. Delachaux & Niestlé, 157 p.
- **Redden, B., Leonforte, T., Ford, R and Croser, J.S., 2005.** Pea (*Pisum sativum* L.), In: Singh, R.J. and Jauhar, P.P. (Eds.), Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement "Grain Legumes", CRC Press, Boca Raton, pp.58 - 98.
- **Rispail, N. and Di Pietro, A., 2009.** The transcription factor *Ste12* mediates the MAPK Fmk1 pathway to control pathogenicity and sporulation in *Fusarium oxysporum*", Molecular Plant-Microbe Interaction, 22, 830 - 839.

- **Rodriguez Galvez, E. and Mendgen , K ., 1995.** The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. *Protoplasma* 189, 61–72.
- **Rubiales, D., Ambrose, M.J., Domoney, C. and Burstin, J., 2012.** Pea (*Pisum sativum* L.).In: Perez de la Vega, M., Cubero, J.I., Torres, A.M. (eds) Genetics, genomics and breeding of cool season grain legumes. CRC Press, Boca Raton FL y Science Publishers, Enfield, NH, pp. 1 - 49.
- **Saxena, N.P., 1993.** Selection for drought and salinity tolerance in cool season food legumes, In: Singh, K.B., Saxena, M.C.(eds) Breeding for stress tolerance in cool season food legumes, ICARDA/John Wiley and Sons, Chichester, UK, pp.245 - 270.
- **Sharma, A., Rathour, R., Plaha, P. et al., 2010.** Induction of fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*) resistance in garden pea using induced mutagenesis and in vitro selection techniques. *Euphytica* 173, 345–56.
- **Smith, I.M., J. Dunez, D.H. Phillips, R.A. and Lelliott, S.A., 1988.** European hbook of plant diseases. Blackwell Scientific Publications: Oxford, (Blackwell Publishing: Iowa, USA), p 583.
- **Smykal, P., Kenicer, G., Flavell, A.J., Corander, J., Kosterin, O., Redden, R.J., Ford, R., Coyne, C.J., Maxted, N., Ambrose, M.J. and Ellis, N.T.H., 2011.** Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genet. Resour.* 9, 4e18.
- **Synder W.C., 1932.** Seed dissemination in *fusarium oxysporum* wilt of pea. *Phytopathology*, 22 : 253 – 257.
- **Tello, J.C. and Lacas, A., 1990.** *Fusarium oxysporum* en los cultivos intensivos del litoral mediterraneo de Espana. Fases parasitica (Fusariosis vasculares del tomate y del clavel) y no parasitaria. *BolSan Vegno.*, pp 19-190.
- **Tessier, B.J., Mueller, W.C. and Morgham, A.T., 1990.** Histopathology and ultrastructure of vascular response in Pea resistant or susceptible to *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. *Phytopathology*, 80: 756-764.
- **Toua, D., Benchabane, M., Bensaid, F. and Bakour, R., 2013.** Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of fusarium wilt in tomato and flax. *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 7(48): 5449-5458.

- **Vidhyasekaran, P., 2008.** Fungal Pathogenesis in Plants and Crops: Molecular Biology and Host Defense mechanisms, CRC Press, Boca Raton, p536.
- **Wang, H.X. and Ng, T.B., 2006.** An antifungal protein from the pea *Pisum sativum* var. *arvense* Poir, Peptides, 27, pp.1732 - 1737.
- **Webster, J. and Weber, R.W.S., 2007.** Introduction to Fungi. Cambridge University Press, p 875.
- **Ye, X.Y. and Ng, T.B., 2003.** Isolation of *Pisum* in a novel antifungal protein from legumes of the sugar snap pea *Pisum sativum* var. *macrocarpon* , Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 134, pp.235 - 240.

Annexes

Annexe 1

Milieux de culture utilisés

Milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*).

- ❖ Pomme de terre 200 g.
- ❖ Dextrose 20 g.
- ❖ Agar 15 g.
- ❖ Eau distillée stérile 1 000 ml.

Autoclavage 20 min à 120° C.

Milieu PDB (*Potato Dextrose Broth*).

- ❖ Pomme de terre 200 g.
- ❖ Dextrose 20 g.
- ❖ Eau distillée stérile 1 000 ml.

Autoclavage 20 min à 120° C.

Annexe 2

ANOVA appliquée aux taux d'infection des 15 géotypes du pois en interaction avec les deux souches pathogènes de *Fop* (R1 et R2)

Facteur	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F-ratio	Valeur p
Géotypes	30321,938	17	1783,643	6,542	0,000 ^{***}
Souches	21862,399	1	21862,399	80,184	0,000 ^{***}

(***) Différence très hautement significatives.

Annexe 3

Valeurs des taux d'infection de quelques géotypes en interaction avec la souche R1 de *Fop*

Géotypes \ Jours	7j	10j	13j	16j	19j	22j	25j	28j	31j
2367	26,42857	34,54762	37,26984	32,66667	34,60606	34,78788	36,10101	52,40404	56,29759
3068	24,7619	36,07143	38,21429	38,57143	33,5	32,78788	35,93939	41,54545	62,76224
2905	47,18254	52,46032	44,44444	39,36364	45,25253	44,96503	49,09091	56,19048	65,49817
P26	52,09524	55,77778	50,81746	55,83333	58,33333	58,89744	57,69231	59,93207	58,18182
2995	46,66667	52,97619	47,61905	54,16667	53,98148	61,81818	61,81818	63,63636	63,63636
3030	50	62,5	52,23214	54,46429	54,86111	65,27778	62,5	72,72727	71,40152
3106	28,80952	42,5	41,94444	48,27778	52,27273	44,09091	53,52681	61,07226	71,81319
2329	44,90476	47,04762	56,57143	59,07143	56,98413	61,74603	60	58,88889	59,72222
2372	34,66667	41,71429	48,46032	50,5	49,66667	54,86869	58,18182	61,33333	60

j : jours après l'inoculation.

Valeurs des taux d'infection de quelques géotypes en interaction avec la souche R2F42 de *Fop*

Géotypes \ Jours	7j	10j	13j	16j	19j	22j	25j	28j	31j
2367	33,57143	55	58,38889	50,38889	51,77778	62,72222	76	78	80,90909
3068	16,38095	44,7381	45,2381	51,90476	61,2381	64,57143	65,84416	65,84416	81,55844
2905	64,16667	67,18254	72,11111	75,27778	93,33333	97,77778	100	100	100
P26	43,21429	47,18254	48,79365	53,27778	55,5	63,59091	64,44444	66,26263	76,56566
2995	30,15873	52,38095	80,15873	100	100	100	100	100	100
3030	51,78571	61,60714	80,80357	100	100	100	100	100	100
3106	29,04762	41,78571	46,07143	57,14286	64,28571	88,57143	91,42857	97,14286	100
2329	63,33333	81,90476	88,57143	90	92,5	92,5	92,5	91,11111	91,11111
2372	55	67,71429	78,78571	100	100	100	100	100	100

j : jours après l'inoculation.

Annexe 4

Valeurs des taux d'infection de quelques géotypes en interaction avec la souche R1 de *Fop*

Géotypes \ Jours	7j	10j	13j	16j	19j	22j	25j	28j	31j
M.Kelvedon	0	6,666667	6,666667	28,09524	31,42857	31,42857	30,47619	44,7619	49,64286
P21	31,11111	29,36508	45,2381	52,08333	59,02778	58,7963	67,59259	69,30556	75,69444
2946	43,33333	45,55556	51,66667	57,93651	72,61905	70,3373	68,84921	70,03968	74,00794
P648	37,33333	38,02597	43,56061	45,60606	50,35897	51,2381	52,66667	53,98077	54,13704
2998	37,80952	48	56,42857	54,5202	58,05556	61,83838	63,66667	75,69697	82,98368
3044	31,71429	43,80952	39,28571	35,79365	34,72222	30,6	57,69697	39,59596	57,66667
2714	52,5	52,14286	60,71429	58,03571	59,77183	46,69524	60,82702	63,09975	63,09975
26	27,14286	37,5	44,44444	51,66667	60	65	65	63,63636	70,83333
3034	34,47619	35,95238	41,07143	42,38095	43,84921	50,16667	53,95455	57,12121	55,76923

j : jours après l'inoculation.

Valeurs des taux d'infection de quelques géotypes en interaction avec la souche R2F42 de *Fop*

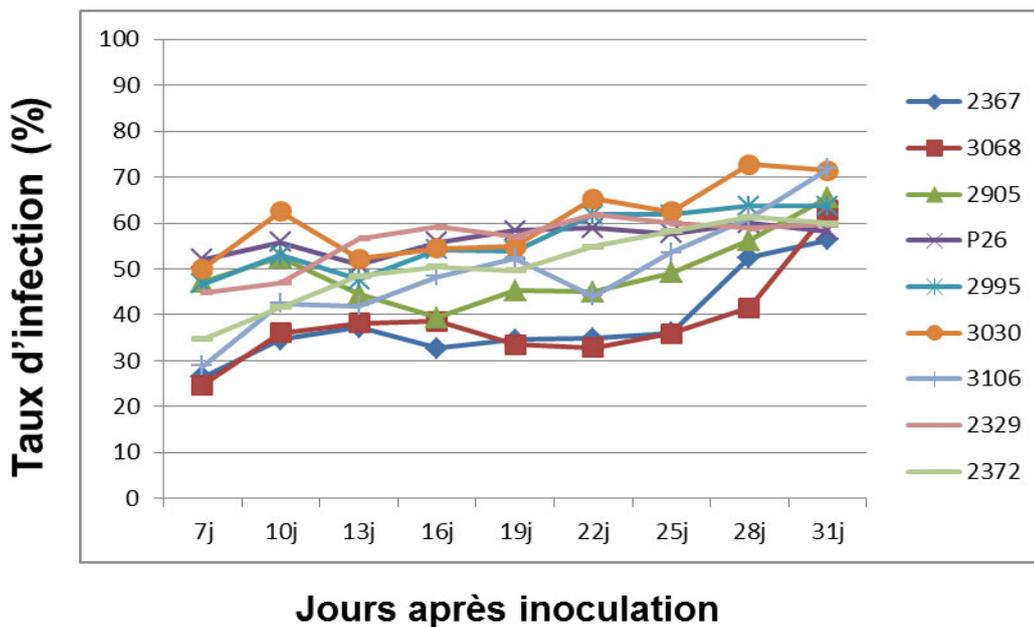
Géotypes \ Jours	7j	10j	13j	16j	19j	22j	25j	28j	31j
M.Kelvedon	0	0	0	0	0	3,333333	6,666667	13,57143	21,42857
P21	38,33333	40	70,31746	76,66667	82,38095	97,91667	100	100	100
2946	34,44444	41,66667	60	73,88889	81,19048	92,46032	97,22222	100	100
P648	58,07143	73,33333	86,38889	95,55556	100	100	100	100	100
2998	44,64286	53,33333	97,5	100	100	100	100	100	100
3044	24,04762	50	50,31746	46,66667	45,77778	48,05051	47,77273	46,27273	50,92075
2714	62,5	100	100	100	100	100	100	100	100
26	43,75	53,47222	82,63889	100	100	100	100	100	100
3034	36,66667	64,28571	90,95238	100	100	100	100	100	100

j : jours après l'inoculation.

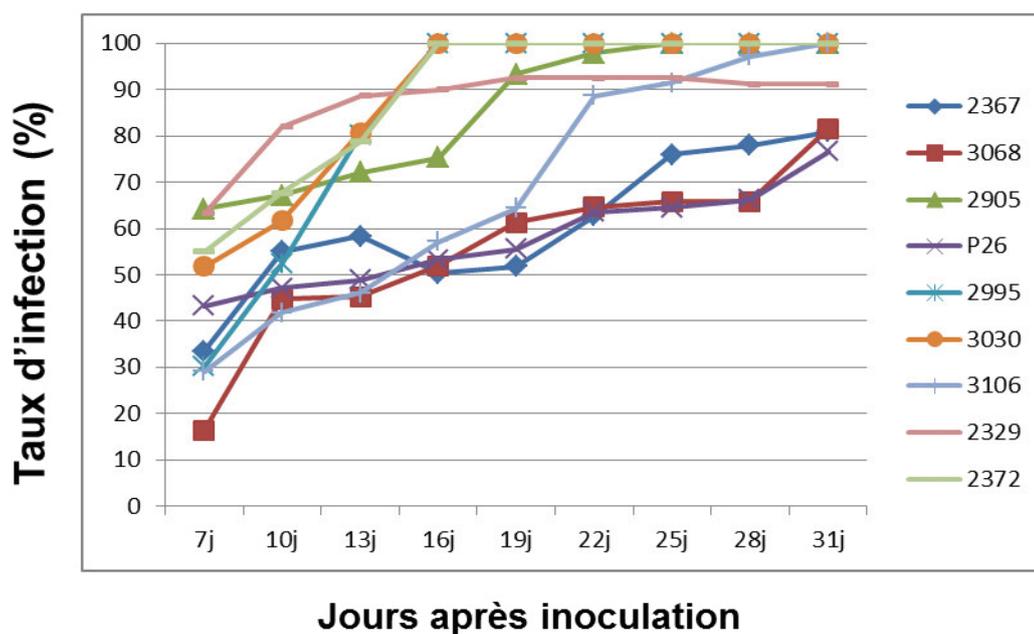
Annexe 5

Evolution des taux d'infection des 9 génotypes inoculés avec les souches
R1 et R2F42 de Fop

R1



R2F42



Introduction

Chapitre I.

Synthèse bibliographique

Chapitre II.

Matériel et méthodes

Chapitre II.

Résultats et discussion

Conclusion

Références Bibliographiques

Annexes