



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Amar Telidji- Laghouat

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : NACIRI Khadidja

DOMAINE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE (SNV)
FILIERE DES SCIENCES AGRONOMIQUES
OPTION PROTECTION DES VEGETAUX ET

Thème

**Contribution à L'étude des Rhizobactéries Isolées à Partir
de La Rhizosphère du Petit Pois (Pisum Sativum)**

Jury de soutenance :

Mr . MOULAY Adel

M AA

Président

Mr . SARIDI Abdelkader

M AA

Examineur

M^{elle} AMEUR Djamila

M AA

Rapporteuse

Promotion : 2023

Remerciements

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
(قُلْ أَعْمَلُوا فِيسِرَى اللَّهِ عَمَلَكُمْ وَرَسُولِهِ وَ الْمُؤْمِنُونَ)
صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمِ

Je remercie الله de nous avoir donné la santé et la volonté de commencer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord Je tiens à remercier les membres du jury, ***Mr.MOULAY Adel*** et ***Mr.SRIDI Abdelkader***, pour la lecture de ma thèse, ainsi que pour les commentaires qu'ils m'adresseront lors de cette soutenance afin d'améliorer mon travail. , ce travail n'a pas été riche et ne s'est pas fait sans l'aide et l'encadrement de ***Mme AMEUR Djamila***, je la remercie pour son encadrement, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité lors de ma préparation de ce memoire.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes enseignements : ***Mme.RANAN Zahra***, ***Mme.AZOUAOU Karima***, ***Mme.MARFOUA Mariem***, ***Mme.TAKHI Djalila***, ***Mr.SERIDI Abdelkader***, ***Mr.MECHRAOUI Choib***, ***Mr.AMARA Yacine*** pour leur aide pratique, leur soutien moral et leurs encouragements.

Je tiens également à remercier tous les enseignants du Département des Sciences agronomiques pour leur générosité et leur grande patience.

Je tiens également à remercier les ingénieurs du laboratoire pour leur aide, ***Mme.TAIBI Halima***, ***Mme.AOUISSI Fatima*** et ***Mme.OTHMANI Rokaia***.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

*Chère maman **Zohra**, qui a été un soutien fort et fondamental pour mon cheminement étape par étape toute ma vie, qui m'a toujours soutenue en toutes circonstances et m'a donné la force et la volonté d'avancer les mots ne suffisent pas pour exprimer toute l'affection que je ressens pour toi J'ai toujours été une mère exemplaire, je te demande de permettre et merci encore. Dieu vous donne la santé et une longue vie.*

*Mon cher père **Belkacem**, la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le Bonheur de mon existence, qui a sacrifié toute sa vie pour me voir devenir ce que je suis, il me manque les mots pour vous exprimer toute ma fierté, qui n'a d'égale que le plein accomplissement de votre devoir de père. Que ce travail soit une récompense pour tout ce que tu as fait pour moi. Je souhaite que Dieu me le garde.*

*Mes chers frères **Mohammed Tidjani** et **Tayeb Elhabib**, Je ne peux exprimer à tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous. je vous souhaite de succès et la persévérance.*

*Ma chère sœurs **Kaouther**, Priez ALLAH de vous sauver de tout mal.*

*A ma copine **Oum Elkhair khadidja**, Merci pour les bonns moments qu'on a passés ensemble, je prie ALLAH pour le succès et le succes durable.*

*A mon amis **Batoul.B** Merci pour ce que tu m'as donné.*

*A mes enseignants qui m'ont apporté leur soutien positif **AMUER.D** et **RANANE.Z** et **AZOUAOU.K**.*

Tous ceux qui me sont trop chers et que j'ai omis de citer. Sans oublier tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de prés

NACIRI Khadidja

Résumé

Dans cette recherche, l'utilisation de techniques biologiques pour lutter contre le fusarium vasculaire chez le pois (*Pisum sativum*) par l'interaction de bactéries racinaires et de maladies fongiques a été étudiée. Les bactéries antifongiques de la rhizosphère pathogènes pour les plantes sont l'un des principaux facteurs de lutte contre les maladies des plantes par des méthodes biologiques. Dix souches bactériennes ont été isolées de la rhizosphère de pois cultivés, et ces souches ont été identifiées sur la base de tests biochimiques et biophysiques et des caractéristiques morphologiques des bactéries.

Dans le cadre de nos expériences biostimulation, nous avons étudié l'activité des enzymes (amylase, cellulose, phosphatase, lipase) pour comprendre comment les bactéries réagissent à diverses sources de substrats et l'influence des conditions environnementales sur ces réactions enzymatiques. Cette étude a été réalisée en utilisant 8 isolats bactériens différents, et elle a abouti à la découverte d'un effet catalytique des enzymes dans ces processus. De plus, l'activité des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) a été étudiée et dans ce contexte, la plupart des isolats bactériens ont montré leur capacité à améliorer les réactions phosphatées. Nous avons également observé la production de composés tels que l'hydrocyanure (HCN) et l'acide indole oxine (AIA), ainsi que la production d'ammoniac(NH₄). Ces résultats améliorent notre compréhension de l'impact des bactéries sur les processus enzymatiques et leur capacité à stimuler la croissance des plantes, et indiquent l'importance des bactéries PGPR dans la promotion de la santé des plantes et de la durabilité environnementale. En plus de l'activité antifongique *in vivo*, un test de confrontation antifongique de 8 isolats a été réalisé vis-à-vis de quatre espèces *Fusarium graminearum* (FG); *Fusarium culmorum* (FC); *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, (FOL); *Fusarium oxysporum* f. sp. *Pisi* (FOP) et a été réalisé sur deux milieux de culture différents (TSA) et (KB). En conséquence, nous avons constaté que la plupart des isolats se sont avérés capables d'arrêter la maladie.

Mots clés : *Pisum sativum* ; fusarium vasculaire ; biostimulation ; PGPR ; *Fusarium graminearum* (FG); *Fusarium culmorum* (FC); *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, (FOL); *Fusarium oxysporum* f. sp. *Pisi* (FOP) ; l'hydrocyanure (HCN) ; l'acide indole oxine (AIA) ; production d'ammoniac(NH₄)

Abstract

In this research, a study was conducted on the use of biological techniques to combat vascular Fusarium in the pea plant (*Pisum sativum*) through the interaction of Root bacteria with fungal disease. Plant-pathogenic antifungal rhizosphere bacteria are a key factor in combating plant diseases by biological methods. Ten bacterial strains were isolated from the rhizosphere of cultivated peas, and these strains were identified based on biochemical and biophysical tests and morphological characteristics of bacteria.

During biocatalytic experiments, the activity of enzymes (amylase, cellulase, phosphatase, and lipase) was studied to understand the interaction of bacteria with various sources of substrates and the influence of environmental conditions on these enzymatic reactions. Eight (8) different bacterial isolates were used in this study, and the results showed a catalytic effect on enzymes in these processes. In addition, the activity of rhizobacteria promoting plant growth (PGPR) has been studied, since most bacterial isolates have shown their ability to enhance phosphate reactions. We also noted the production of compounds such as hydrocyanide (HCN) and acid indole oxine (AIA), as well as the production of ammonia (NH_4). These results strengthen our understanding of the influence of bacteria on enzymatic processes and their ability to stimulate plant growth, and indicate the importance of PGPR bacteria in promoting plant health and environmental sustainability. In addition to its antifungal activity, the antifungal confrontation test was carried out using eight different isolates of four types of Fusarium (FG, FC, FOL, FOP) and the test was carried out on two different Agricultural Media (TSA and KB), the results of which showed the ability of most isolates to stop the disease.

Key words: *Pisum sativum* ; vascular Fusarium ; biostimulation ; PGPR ; *Fusarium graminearum* (FG); *Fusarium culmorum* (FC); *Fusarium oxysporum* *F. sp. lycopersici*, (FOL); *Fusarium oxysporum* *f. sp. Pisi* (FOP) ; hydrocyanide (HCN) ; acid indole oxine(AIA), production of ammonia(NH_4)

ملخص

في هذا البحث، أجريت دراسة حول استخدام التقنيات البيولوجية لمكافحة الفوزاريوم الوعائي في نبات البازلاء (*Pisum sativum*) خلال تفاعل البكتيريا الجذرية مع المرض الفطري. تعتبر بكتيريا الريزوسفير المضادة للفطريات الممرضة للنباتات عاملاً رئيسياً في مكافحة الأمراض النباتية بطرق بيولوجية. تم عزل عشر سلالات بكتيرية من ريوسفير البازلاء المزروعة، وتم تحديد هذه السلالات بناءً على الاختبارات البيوكيميائية والبيوفيزيائية والخصائص المورفولوجية للبكتيريا.

خلال التجارب الحيوية التحفيزية، تمت دراسة نشاط الإنزيمات (الأميليز، السليلوز، الفوسفاتاز، الليباز) لفهم تفاعل البكتيريا مع مصادر مختلفة من الركائز وتأثير الظروف البيئية على هذه التفاعلات الإنزيمية. استخدمت ثماني (8) عزلات بكتيرية مختلفة في هذه الدراسة، وأظهرت النتائج تأثيراً تحفيزياً على الإنزيمات في هذه العمليات. بالإضافة إلى ذلك، تمت دراسة نشاط ريوسفير بكتيريا تعزيز نمو النباتات (PGPR)، حيث أظهرت معظم العزلات البكتيرية قدرتها على تعزيز تفاعلات الفوسفات. لاحظنا أيضاً إنتاج المركبات مثل الهيدروسيانيد (HCN) والأكسين الأندولي الحمضي (AIA)، بالإضافة إلى إنتاج الأمونياك (NH₄). تعزز هذه النتائج فهمنا لتأثير البكتيريا على العمليات الإنزيمية وقدرتها على تحفيز نمو النباتات، وتشير إلى أهمية بكتيريا PGPR في تعزيز صحة النباتات والاستدامة البيئية. بالإضافة إلى نشاطها المضاد للفطريات، تم إجراء اختبار المواجهة المضادة للفطريات باستخدام ثماني عزلات مختلفة لأربعة أنواع من *Fusarium* (FG)، FOL، FC، FOP وتم تنفيذ الاختبار على وسطين زراعيين مختلفين (TSA وKB)، حيث أظهرت النتائج قدرة معظم العزلات على إيقاف المرض.

كلمات مفتاحية: (*Pisum sativum*) ; الفوزاريوم الوعائي ; الحيوية التحفيزية ; *Fusarium graminearum* (FG) ; (PGPR) ;
Fusarium culmorum (FC); *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, (FOL); *Fusarium oxysporum f. sp. Pisi* (FOP) ; الهيدروسيانيد (HCN) والأكسين الأندولي الحمضي (AIA), إنتاج الامونياك (NH₄).

Liste des abréviations

AIA: Activité Acide indol acétique

BGN : Bacille Gram négatif

FC: *Fusarium culmorum*

FG: *Fusarium graminearum*

FOL: *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*,

Fop: *Fusarium oxysporum f. sp. Pisi*

GN : Gélose nutritive

H₂S : Sulfure d'hydrogène

HCN : acide cyanhydrique

KB: King B

N₂: Azote

NH₄⁺ : production de l'ammoniac

NO₂: Nitrites

NO₃: Nitrates

PGPR: Plant growth promoting rhizobacteria

Liste des figures

Figure 1	Symptômes de la fusariose vasculaire du pois. https://www.nexles.com/article/pois-pisum-sativum-traitements-plus-courantes-maladies-ravageurs-legume/	8
Figure 2	Cycle infectieux de <i>Fusarium oxysporum</i> (Agrios, 2005).	11
Figure 3	Les mécanismes d'action des rhizobactéries (Ramos et al., 2009).	14
Figure 4	Structure chimique du Flavonoïde	17
Figure 5	Infection intracellulaire chez les Légumineuses. La bactérie colonise la rhizosphère et entre en contact avec le poil racinaire (A). Les facteurs Nod induisent la courbure du poil racinaire ce qui permet la création d'une zone confinée pour la bactérie qui initie l'infection (B). La mise en place du cordon d'infection suit le déplacement du Noyau vers la base du poil (C). D'après Perret et al., 2000.	18
Figure 6	la mesure de la longueur des plantules	31
Figure 7	Résultats du test mobilité	35
Figure 8	Résultats du Test de Citrate de Cimone (CIT)	35
Figure 9	résultats du test TSI	36
Figure 10	résultats du test d'hypersensibilité	37
Figure 11	Photo représentant les résultats de l'identification biochimique d'une galerie API 20 NE.	38
Figure 12	Résultats de l'isolats productrice d'HCN	39
Figure 13	Résultats de l'activité enzymatique des isolats testés	41
Figure 14	Taux d'inhibition des souches bactériennes contre les souches fongiques (FG, FOL, FC, FOP) sur les milieux TSA et KB	42
Figure 15	Inhibition de la croissance mycélienne par confrontation directe.	43
Figure 16	Effet du l'interaction du facteur bactérisation et le facteur suspension fongiquesur le taux de germination (%)	44
Figure 17	Effet du l'interaction du facteur bactérisation et le facteur suspension fongique surl'indice de vigueur.	44

Liste des tableaux

Tableau 1	Teste biochimique et physiologique	37
Tableau 2	Résultats de l'identification biochimique des isolats obtenues en utilisant la galerie API 20 NE.	38
Tableau 3	Effets de la température sur la croissance bactérienne	39
Tableau 4	Production AIA ; (NH ₄ ⁺) ; d'HCN par les isolats bactériens	40
Tableau 5	Résultats de l'activité enzymatique des isolats testés	40

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des Figures

Liste des tableaux

Sommaire

INTRODUCTION 1

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 Petit Pois	5
I. 2 Importance économique	6
I.2 Fusariose vasculaire	6
I.3.1 <i>Fusarium oxysporum f.sp. pisi</i>	6
I.2. 2 Taxonomie	7
I.2.3 Symptomatologie	8
a. Formation et germination des spores	9
b. Infection	9
c. Développement de la maladie	10
I.2.4 Méthodes de lutte	11
A. Lutte culturale	11
B. Lutte chimique	12
c. Lutte biologique	12
I.3 Les rhizobactéries	12
I.3.1 Rhizobactéries Favorisant la Croissance des Plantes	13
I.3.1.1 Rhizobactéries Non-Symbiotiques	15
I.3.1.2 Rhizobactéries symbiotiques: <i>Rhizobium</i> sp	15

I.3.1.2.1 Symbiose fixatrice d'azote	15
I.3.1.2 2 Processus de la Fixation Symbiotique de L'azote Atmosphérique	16
a. Préinfection	16
b. Infection	17
c. Développement du nodule	18

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

II.1 Isolement des rhizobactéries	20
II.2 Identification des isolats bactériens	20
II.2.1 Teste biochimique et physiologique	20
II.2.1.1 Solubilité en KOH	20
II.2.1.2 Coloration de Gram	21
II.2.1.3 Croissance en anaérobiose (Test de Hugh Leifson)	21
II.2.1.5 Test de Mobilité	22
II.2.1.6 Test de Citrate de Cimone (CIT)	22
II.2.1.7 Gélose Triple Sugar Iron (TSI)	23
II.2.1.8 Test Cystine	23
II.2.1.9 Galerie API 20 NE	24
a. Préparation des inoculums	24
b. Inoculation de la galerie	24
II.2.1.10 Sensibilité des souches isolées au pH	25
II.2.1.11 Sensibilité des souches isolées à la température	25
II.2.1.12 Test d'hypersensibilité	25
II.3 Recherche des activités enzymatique	25
a. Lipase	25
b. Amylase	26
c. Phosphatase	26
d. Cellulase	26
e. Protéase	27
f. Pectinase	27
II.4 Activité antifongique par confrontation directe in vitro	27
II.4.1 Dispositif expérimentale	28
II. 5. Activité PGPR	28
a. Activité Acide indol acétique AIA	28

b. Activité de l'acide cyanhydrique (HCN)	29
c. Activité Ammoniac (NH ₄ ⁺)	29
II.6. Essai de biocontrôle de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>pisii</i> in vivo	29
II.6. 1. Bactrisation et contamination de la semence	30
II.6.2. Dispositif expérimentale	30
II.6.3. Paramètres mesurés	30
a. Taux de germination	30
b. Détermination de la longueur des racines et la tige	31
c. Indice de vigueur	31
II.7. Analyse statistique	32

CHAPITRE 3 RESULTATS ET DISCUSSION

II.1. Résultats	34
III.1.1 Identification des isolats bactériens	34
III.1.1.1 Test KOH	34
III.1.1.2 Coloration de Gram	34
III.1.1.3 Test de Mobilité	34
III.1.1.4 Test de Citrate de Cimone (CIT)	35
III.1.1.5 La gélose Triple Sugar Iron (TSI)	36
III.1.1.6 Test d'hypersensibilité	36
III.1.1.7 Galerie API 20 NE	37
III.1.1.8 Sensibilité des souches isolées à la température	39
III.1.2. Activité PGPR	39
a. Activité Acide indol acétique (AIA)	39
b. Activité de l'acide cyanhydrique (HCN)	39
c. Activité Ammoniac (NH ₄ ⁺)	40
III.1.2 Recherche des activités enzymatiques	40
III.1.3 Activité antifongique par confrontation directe in vitro	41
III.1. 4. Les résultats relatifs à l'essai de biocontrôle de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>pisii</i> in vivo	43
III.1. 4.1. Effet sur le taux de germination (TG)	43
III.1. 4.2. Effet sur l'indice de vigueur	44
III.2. Discussion	46
Conclusion	51

Perspectives

52

Référence

53

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Sur la base de l'utilisation sans cesse croissante de pesticides chimiques et de la propagation d'une résistance totale aux pesticides, la maladie de la fusariose vasculaire du Pois dont l'agent causale le *Fusarium oxysporum* fsp. *pisi* (FOP), nous nous sommes tournés vers la recherche d'une solution biologique pour lutter contre ce problème. Au cours de cette recherche, nous avons isolé des bactéries spécifiques présentes dans la rhizosphère des plantes, connue sous le nom de PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), afin d'examiner sa présence et sa capacité potentielle à favoriser la croissance des plantes.

Les PGPR, ou "Plant Growth-Promoting Rhizobacteria", forment un groupe essentiel de micro-organismes présents dans la rhizosphère des plantes. Leur impact positif sur la croissance, la santé et la productivité des cultures est de plus en plus reconnu et étudié (Lugtenberg et Kamilova, 2009). Parmi les groupes microbiens du sol qui s'influent sur la croissance des plantes, on peut citer *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Enterobacter* et *Azotobacter* sp, *Serratia*, et en particulier le genre *Bacillus* qui forme des spores qui lui donne une certaine résistance à la température, et à la concentration élevée des produits chimiques, impliquant un potentiel PGPR particulier (Kumar *et al.*, 2012 ; Osman *et al.*, 2017).

Ces bactéries ont élaboré des mécanismes complexes pour établir des interactions bénéfiques avec les plantes. Parmi leurs fonctions essentielles, on peut citer la fixation de l'azote atmosphérique, qui contribue à la nutrition des plantes en azote, la solubilisation des éléments nutritifs du sol, la production d'hormones de croissance végétale, et la compétition avec les pathogènes du sol pour l'accès aux ressources. Ces interactions positives ouvrent des perspectives significatives pour une agriculture plus durable en réduisant la dépendance aux produits chimiques agricoles potentiellement préjudiciables pour l'environnement.

Fusarium oxysporum f. sp. *pisi* (Fop) est un agent pathogène destructeur, causant la fusariose vasculaire chez le pois (*Pisum sativum*). Sa présence a été observée dans toutes les régions où la culture du petit pois est pratiquée (Kraft et Pflieger, 2001). Cette maladie particulièrement dévastatrice entraîne des pertes économiques importantes en raison de sa sévérité (Kraft *et al.*, 1998).

La fusariose du petit pois est une maladie fongique qui affecte spécifiquement les pois (*Pisum sativum*) et est causée par différentes espèces de champignons du genre *Fusarium*. Cette maladie est particulièrement préoccupante pour les cultivateurs de pois car elle peut entraîner des pertes de rendement considérables. Les symptômes de la fusariose du pois comprennent le

INTRODUCTION

Flétrissement des plantes, la nécrose des tissus vasculaires et la décoloration des feuilles. Les champignons *Fusarium* responsables de cette maladie peuvent survivre dans le sol pendant de longues périodes, ce qui rend difficile la gestion de la maladie. Les méthodes de lutte incluent souvent l'utilisation de semences résistantes et de pratiques culturales visant à réduire la pression du pathogène (Halila *et al.*, 2000).

Notre objectif à travers cette étude consistée à chercher des bactéries dans la rhizosphère du petit pois (*Pisum sativum*). L'étude de la diversité des populations rhizosphériques a été effectuée après isolement, purification et identification préliminaire des populations bactériennes. Alors notre expérimentation consiste à :

- Isoler à partir de la rhizosphère du petit pois (*Pisum sativum*) ;
- Identifier et caractériser ces isolats en réalisant des tests biochimiques et physiologiques, complétaient par l'utilisation de la galerie API 20 NE ;
- Activité PGPR
- Recherche de l'activité enzymatique des isolats sélectionné *in vitro* ;
- Recherche de l'activité antagonismes *in vitro* vis-à-vis de quatre champignons phytopathogènes (*Fusarium graminearum* (FG) ; *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL); *Fusarium culmorum* (FC); *Fusarium oxysporum* f.sp. *Pisi* (FOP)) ;
- Essai de biocontrôle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi in vivo*

Ce mémoire est structuré en trois chapitres distincts, chacun abordant des aspects spécifiques de la recherche :

*Chapitre I : Contexte et Synthèse Bibliographique

Dans ce premier chapitre, nous nous plongerons dans une synthèse bibliographique approfondie concernant *Pisum Sativum* L., en mettant particulièrement l'accent sur le petit pois, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* (Fop),. Ainsi que sur la rhizobactérie

*Chapitre II : Matériel et Méthodes

Le deuxième chapitre est réservé à la description du matériel utilisé dans cette étude, ainsi qu'à une explication détaillée des méthodes et des protocoles employés pour la recherche.

*Chapitre III : Résultats et Discussion

INTRODUCTION

Dans le troisième chapitre, nous présenterons les résultats obtenus au cours de l'étude, suivis d'une discussion approfondie visant à interpréter ces résultats et à en examiner les implications.

En conclusion, ce mémoire se clôture par une synthèse générale qui résume les principales découvertes et conclusions tirées de cette recherche.

Chapitre 1

Synthèse Bibliographique

I.1 Petit Pois

Le pois (*Pisum sativum* L.) occupe une place prépondérante en tant que deuxième légumineuse la plus cultivée dans le monde. Cette culture à grains est largement exploitée depuis plusieurs siècles en tant que source essentielle de protéines pour l'alimentation animale et humaine, ce qui lui confère une importance économique mondiale considérable. Cependant, les rendements sont souvent affectés par des contraintes tant abiotiques que biotiques.

Les pois possèdent une grande diversité d'utilisations finales. Les feuilles, les gousses vertes et les graines immatures ou mûres sont utilisées comme aliments pour animaux, incluant des pratiques telles que le pâturage direct, la production de foin et l'ensilage. Un aspect essentiel des légumineuses, auquel appartient le pois, est leur capacité de fixation symbiotique de l'azote. Cette capacité est d'une importance capitale en tant que source d'azote dans les écosystèmes naturels et agricoles, soulignant ainsi leur rôle crucial dans la fertilité des sols et la croissance des cultures.

En plus de leur valeur nutritionnelle, les pois et d'autres légumineuses accumulent également des métabolites secondaires, tels que les isoflavonoïdes, qui sont réputés pour leurs propriétés bénéfiques pour la santé humaine, notamment des effets anticancéreux et d'autres avantages pour la promotion de la santé [Smýkal *et al*, 2013].

(<https://boowiki.info/art/fabeae/pisum-sativum.html>)

Règne : Végétal
Embranchement : Spermaphytes
Sous embranchement : Angiospermes
Classe : Dicotylédones
Ordre : Fabales
Famille : Fabacées
Sous famille : Fabeae
Genre : *Pisum*
Espèces : *Pisum sativum. L*

L'espèce *Pisum sativum* L. regroupe plusieurs sous-espèces, classées comme suit :

- *Pisum sativum* L. subsp. *sativum* Var. *sativum* : petit Pois, Pois potager ou Pois des jardins.

- *Pisum sativum* L. subsp. *elatius* (Steven ex M. Bieb.) Asch. & Graebn. : Pois sauvage.

- *Pisum sativum* L. subsp. *Sativum* Var, *arvense* L, Poir. Pois fourrager, Pois protéagineux ou Pois des champs.

Il existe chez le petit pois des variétés à rames, d'autres naines, dans ces deux catégories se trouvent des variétés à grains ronds et d'autres à grains ridés (Meudec, 1998).

I. 2 Importance économique

La culture mondiale du petit pois revêt une grande importance économique et se déploie principalement en Europe, en Amérique du Nord, en Amérique du Sud, en Inde et en Afrique (Sibylla, 2009). Selon les données de la FAO (2013), le rendement moyen mondial du petit pois est estimé à 1,72 tonnes/ha. Les principaux pays producteurs de pois frais et secs sont le Canada (35%), la Russie (12%), et la Chine (13%).

En Algérie, la culture du petit pois frais couvre une superficie de 32 641 hectares, avec une production de 127 680 tonnes. Dans la région de l'Afrique du Nord, l'Algérie occupe la troisième position en termes de production de pois, après le Maroc et la Tunisie. Parmi les espèces de légumineuses alimentaires les plus cultivées dans la région, on trouve la lentille, le pois chiche, la fève, le haricot et *Pisum sativum* (FAOSTAT, 2011).

I.2 Fusariose vasculaire

Les espèces de *Fusarium* sont responsables de maladies qui causent d'importantes pertes économiques, telles que le flétrissement vasculaire ou la pourriture racinaire et du collet, chez les plantes cultivées en plein champ et en serre (Fravel *et al.*, 2003). Elles représentent un obstacle majeur dans la production de nombreuses cultures agricoles et horticoles, telles que le pois, le palmier dattier, le lin, l'oignon, la tomate, le coton, et bien d'autres (Mac Hardy et Beckman, 1981). La fusariose vasculaire du pois, causée par *F. oxysporum f.sp. pisi* (Fop), a été signalée dans tous les pays où les pois sont cultivés et peut être particulièrement sévère (Kraft et Pleger, 2001). Il s'agit d'une trachéomycose qui entraîne une perte d'eau et de métabolites nécessaires à la survie des cellules végétales, entraînant ainsi la destruction des composants essentiels des cellules (Agrios, 2005).

I.3.1 *Fusarium oxysporum f.sp. pisi*

Le genre *Fusarium*, initialement décrit par Linke en 1809, appartient à la famille des Tuberculariacées, faisant partie du groupe des Hyphomycètes (champignons filamenteux). En raison de l'absence de reproduction sexuée, ces champignons sont classés dans les

Deutéromycètes (champignons imparfaits), qui regroupent diverses formes asexuées (ou anamorphes). Cependant, certaines espèces de *Fusarium* ont une forme sexuée, également appelée forme parfaite ou téléomorphe, appartenant aux genres *Nectria* ou *Gibberella* (Gams et Nirenberg, 1989), au sein de l'ordre des Hypocréales, ou des Ascomycètes.

F. oxysporum présente un ensemble de formes morphologiquement identiques, mais présentant des spécificités parasitaires parfois très étroites. Plus de 120 formes spécialisées et races ont été décrites chez *F. oxysporum* (Armstrong et Armstrong, 1981), dont la forme spéciale pisi responsable du flétrissement vasculaire du petit pois. Ces races sont souvent déterminées par leur virulence à l'égard d'un ensemble de cultivars d'hôtes différentiels (Correll, 1991).

Les champignons du genre *Fusarium* sont ubiquistes, ce qui signifie qu'ils peuvent s'adapter facilement à toutes les conditions environnementales et sont largement répandus sous différents climats (Burgess et Liddell, 1983). On les trouve particulièrement abondants dans les sols, sur les débris végétaux, ainsi que sur les parties souterraines et aériennes des plantes. Bien que la plupart d'entre eux soient des saprophytes, c'est en tant que phytopathogènes qu'ils sont les plus connus. En effet, de nombreuses espèces végétales sont attaquées par des souches de *Fusarium*, tant dans les grandes cultures en plein champ que dans les cultures sous serre, où les dégâts provoqués peuvent être spectaculaires (Nelson, 1981).

I.2. 2 Taxonomie

Selon Agrios (1998), la classification taxonomique de *Fusarium oxysporum* est la suivante :

Règne : Fungi

Division : Ascomycota

Classe : Hymenoascomycètes

Sous-classe : Pyrenomycetideae

Ordre : Hypocreales

Famille : Nectriaceae

Genre : *Fusarium*

Espèce : *Fusarium oxysporum* f. sp. *Pisi*

I.2.3 Symptomatologie

Le *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* est un agent pathogène qui envahit les racines des plants de pois, affectant leur système vasculaire à toutes les étapes de croissance. Les plantes contaminées présentent souvent une coloration rouge, orange ou sombre dans les tissus vasculaires des racines ainsi que dans la partie basse de la tige. Les symptômes sur les feuilles commencent par un jaunissement, suivi d'un flétrissement progressif et d'une courbure vers le bas au moment de la floraison. En cas d'infection précoce, les jeunes plants ont tendance à mourir. L'ampleur de la maladie peut varier en fonction des différentes souches de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. Cependant, cette incidence peut être réduite grâce à des rotations de cultures étendues et à des semis précoces. Jusqu'à présent, la méthode de gestion la plus pratique et économiquement viable consiste à utiliser des variétés de pois résistantes, comme l'ont souligné les recherches de Merzoug *et al.* En 2014.



Figure 1 : symptômes de la fusariose vasculaire du petit pois.

<https://www.nexles.com/article/pois-pisum-sativum-traitements-plus-courantes-maladies-ravageurs-legume/>

Fusarium oxysporum f.sp. *pisi* présente une grande variabilité en termes de capacité pathogène. Onze souches différentes de cet agent pathogène ont été caractérisées, cependant, seules quatre de ces souches ont été soigneusement identifiées (Races : 1, 2, 5 et 6). Cependant, il y a des divergences significatives concernant la classification de ces différentes souches. Parmi ces souches, les races 1 et 2 ont été observées à l'échelle mondiale et peuvent être considérées comme les plus préoccupantes en termes de pertes économiques dans la plupart des régions où les pois sont cultivés. En revanche, les races 5 et 6 n'ont été signalées que dans l'État de Washington (Merzoug *et al.*, 2014).

L'infection réussie d'une plante par *F. oxysporum* est un processus complexe qui implique plusieurs étapes hautement régulées. Ces étapes comprennent :

- a. La reconnaissance des racines par des signaux émis par l'hôte.
- b. L'adhérence à la surface des racines et la différenciation des hyphes de pénétration
- c. La pénétration du cortex racinaire et la destruction des barrières physiques de l'hôte, comme l'endoderme, afin d'atteindre les tissus vasculaires.
- d. L'adaptation à l'environnement hostile de la plante hôte, y compris la capacité à tolérer les composés antifongiques produits par les plantes.
- e. La multiplication des hyphes et la production de microconidies à l'intérieur des vaisseaux du xylème.
- f. La sécrétion de facteurs de virulence tels que de petits peptides ou des phytotoxines (Figure) (Di Pietro et al., 2003).

a. Formation et germination des spores

Pendant les premières phases de leur interaction, les agents pathogènes fongiques doivent repérer les molécules de signalisation émises par la plante, puis réagir en subissant des changements morphogénétiques et biochimiques appropriés. Ce processus de communication représente la première étape cruciale dans la détermination du dénouement de l'infection fongique, déterminant ainsi si l'établissement de la maladie réussit ou échoue (Di Pietro *et al.*, 2003).

En tant qu'occupant du sol, *F. oxysporum* est capable de subsister pendant de longues périodes en l'absence de son hôte, principalement sous la forme de chlamydospores saprophytes (Beckman et Roberts, 1995). Les sécrétions racinaires induisent la germination des chlamydospores en dormance et le déclenchement d'un processus infectieux (Schipper et van Eck, 1981 ; Di Pietro *et al.*, 2003).

b. Infection

Le processus d'infection vasculaire par *F. oxysporum* est une série d'étapes complexes qui sont soigneusement régulées :

- **Adhésion** : Le processus d'infection fongique débute par l'adhésion des hyphes d'infection à la surface de la racine hôte (Bishop et Cooper 1983 ; Di Pietro et al., 2003). L'adhérence du champignon à la surface de l'hôte n'est pas spécifique, car elle peut également

se produire sur des non-hôtes (Vidhyasekaran, 1997). Une adhérence spécifique au site peut être cruciale pour ancrer les propagules à la surface de la racine, ce qui permet la poursuite d'autres processus nécessaires à la colonisation (Recorbet et Alabouvette, 1997).

- **Pénétration** : La pénétration est vraisemblablement gouvernée par une combinaison de divers facteurs, incluant les composés fongiques, les structures de surface de la plante, les activateurs ou les inhibiteurs de la germination des spores fongiques et la formation du tube germinatif (Mendgen *et al.*, 1996). Les mécanismes par lesquels les agents pathogènes de la fusariose vasculaire pénètrent dans les racines peuvent varier. Certains agents pathogènes pénètrent directement dans les racines, tandis que d'autres requièrent une pénétration indirecte à travers des blessures (Lucas, 1998). Les sites les plus fréquents de pénétration directe sont localisés près de l'extrémité des racines (Lucas, 1998). L'agent pathogène entre dans la région apicale de la racine où l'endoderme n'est pas complètement différencié, permettant ainsi au champignon de se développer et d'atteindre le protoxylème en développement. Bien que les blessures mécaniques puissent augmenter l'infection, elles ne sont pas essentielles pour l'infection racinaire latérale (Stover, 1962).

c. Développement de la maladie

La flétrissure peut résulter d'une combinaison d'activités pathogènes, comprenant l'accumulation de mycélium fongique et/ou la production de toxines, ainsi que des réponses défensives de l'hôte, incluant la sécrétion de gels, de gommes, de tyloses et la compression des vaisseaux par la prolifération de cellules parenchymateuses adjacentes (Beckman, 1987 ; Di Pietro *et al.*, 2003). Il est aussi possible que cela résulte de la dégradation des tissus hôtes (Kroes *et al.*, 1998 ; Olivain et Alabouvette, 1999 ; Ouellette *et al.*, 2002). À la suite du flétrissement et du décès de la plante, le champignon parvient à sa surface, générant des chlamydospores qui sont éparpillées dans le sol pour amorcer un second cycle d'infection (Figure 2) (Di Pietro *et al.*, 2003).

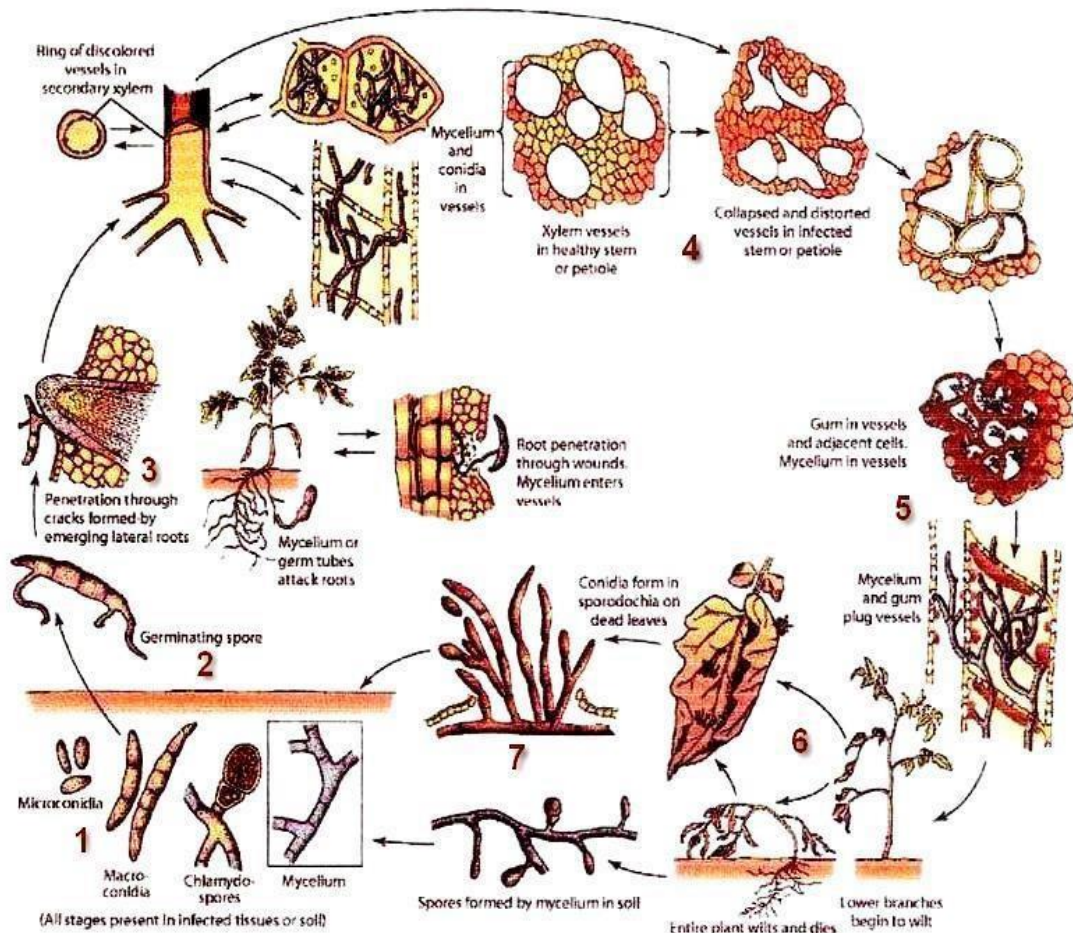


Figure 2 : Cycle infectieux de *Fusarium oxysporum* (Agrios, 2005).

I.2.4 Méthodes de lutte

Parmi les différentes approches de lutte contre la fusariose vasculaire du pois (culturelle, génétique, chimique et biologique), celle qui continue à se montrer efficace est l'emploi de variétés résistantes (Bani, 2015 ; Guimaraes et al., 2007). Cependant, au cours de ces dernières années, le contrôle biologique de la fusariose vasculaire a produit des résultats prometteurs.

A. Lutte culturale

En complément de la résistance génétique, l'alternance des cultures représente une pratique recommandée qui contribue à atténuer les dommages causés par l'agent pathogène. Cependant, il est important de noter que l'efficacité de la rotation des cultures en matière de réduction de la maladie n'est pas négligeable. Ce résultat découle non seulement de la persistance prolongée des chlamydo-spores de Fop, mais aussi de la capacité de l'inoculum à se

multiplier sur les racines des plantes infectées et même sur des plantes non hôtes. Néanmoins, il est possible qu'une rotation des cultures sur une période de cinq ans puisse contribuer à prévenir l'apparition de la fusariose vasculaire chez le pois (Biddle et Cattin, 2007).

B. Lutte chimique

Face à une infection vasculaire, l'emploi de fongicides à action systémique est une option envisageable (Bounaga, 1985). Cependant, les chlamydospores qui sont enfouies en profondeur sur de vastes zones, ainsi que les coûts substantiels associés aux mesures de contrôle chimique, rendent toute tentative de traitement chimique intrinsèquement vouée à l'échec. L'utilisation de traitements chimiques est généralement considérée comme une solution de commodité, en opposition à la lutte biologique qui exige une meilleure compréhension et observation. À long terme cependant, la lutte biologique se révèle plus avantageuse (Corbaz, 1990).

c. Lutte biologique

En vue de contrôler la fusariose vasculaire, une approche de lutte biologique pourrait être mise en œuvre en utilisant des souches spécifiques de *Pseudomonas* spp. fluorescens, de souches non pathogènes de *F. oxysporum*, de *Trichoderma* spp. et de *Gliocladium* spp. (Sakthivel, N., et Gnanamanickam, S.S., 1989). Malgré le potentiel prometteur de ces méthodes, aucune de ces entités n'a encore été officiellement employée pour lutter contre la fusariose (Kraft et Pflieger, 2001 ; Bani, 2015 ; Defago et Haas, 1990). Des souches de rhizobia, capables de fixer l'azote atmosphérique et de solubiliser le phosphore, ont également démontré leur capacité à inhiber la croissance de certains champignons phytopathogènes du sol tels que *Rhizoctonia solani* et *Fusarium culmorum* (Glick et al., 2007).

I.3 Les rhizobactéries

Le sol abrite une vaste gamme de microorganismes, tels que les virus, les bactéries, les champignons, les protozoaires et les algues (Paul et Clark, 1996). Parmi ces microorganismes, les bactéries sont les plus abondantes, comptant en moyenne 6,108 cellules par gramme de sol, ce qui équivaut à un poids de 10 000 Kg/ha, soit environ 5% du poids sec des composés organiques du sol. Leur abondance dans le sol peut s'expliquer par leur capacité de multiplication rapide et leur aptitude à utiliser une grande variété de substrats comme sources d'énergie et de nutriments (Glick, 1995).

Les bactéries associées aux racines des plantes sont communément appelées les rhizobactéries. Ces souches bactériennes sont généralement très compétitives et capables de coloniser le système racinaire, riche en éléments nutritifs, tout au long du cycle de développement de la plante (Kloepper, 1993). Les interactions entre la plante et le sol sont fortement influencées par la densité et l'activité des rhizobactéries. Alors que la plante libère des composés organiques dans le sol, elle puise en retour de l'eau et des éléments minéraux essentiels à son métabolisme.

Les rhizobactéries sont des hétérotrophes typiques, c'est-à-dire qu'elles ont besoin de composés organiques comme source d'énergie. Ces besoins sont largement comblés à l'intérieur de la rhizosphère. En effet, les rhizobactéries utilisent divers substrats fournis par la plante, tels que les cellules corticales et épidermiques qui se détachent, les polysaccharides du mucilage racinaire, les sucres et les acides aminés présents dans les exsudats racinaires, etc. (Campbell et Greaves, 1990).

Ces rhizobactéries sont considérées comme des concurrents microbiens efficaces dans la zone racinaire des plantes. L'effet visible des interactions entre les plantes et ces microorganismes peut être positif, neutre ou négatif. Certaines bactéries ont un effet inhibiteur sur la croissance des plantes, tandis que d'autres la stimulent. Ces dernières sont couramment désignées sous le terme de rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Rhizobacteria : PGPR) (Kloepper et al., 1989 ; Zahir et al., 2004). Ces dernières décennies, un grand nombre de bactéries ont démontré leur capacité à améliorer la croissance des plantes (Kloepper, 1992 ; Glick, 1995).

I.3.1 Rhizobactéries Favorisant la Croissance des Plantes

Les rhizobactéries constituent un groupe essentiel de communautés bactériennes qui ont des effets bénéfiques sur la croissance des plantes lorsqu'elles colonisent les racines. Ce terme, introduit par Kloepper et Schroth en 1978, fait référence aux rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR). Ces bactéries vivantes, en se développant librement et en colonisant les racines, offrent divers avantages tels qu'une amélioration de la croissance des plantes, une réduction des dommages causés par les phytopathogènes et une augmentation de la résistance aux stress abiotiques (Kloepper et al., 1991).

Les PGPR, également connues sous le nom de "Plant Growth Promoting Rhizobacteria", sont des bactéries qui se développent dans la rhizosphère et qui ont un effet

positif sur les plantes, ce qui les qualifie comme des rhizobactéries favorisant la croissance végétale (Dey *et al.*, 2004 ; Herman *et al.*, 2008 ; Minorsky, 2008).

Ces PGPR peuvent avoir un impact bénéfique sur les plantes de manière directe ou indirecte (Figure 3). L'effet bénéfique direct des bactéries PGPR peut résulter de plusieurs facteurs : une augmentation de la disponibilité de nutriments, tels que l'azote fixé librement ou le phosphate solubilisé (Dobbelaere *et al.*, 2003), une amélioration de la microstructure du sol dans la rhizosphère, favorisant ainsi la rétention d'eau, une modification de l'équilibre hormonal de la plante, incluant la production de phytohormones et la désamination du précurseur de l'éthylène (Glick *et al.*, 1998 ; Dobbelaere *et al.*, 2003), et l'induction d'une réponse systémique chez la plante, telle que ISR (Induced Systemic Resistance) ou, plus rarement, SAR (Systemic Acquired Resistance).

De nombreuses études ont démontré que ces rhizobactéries jouent un rôle dans le biocontrôle des plantes en réduisant les effets néfastes des phytopathogènes. Elles accomplissent cela en synthétisant des antibiotiques spécifiques (Fischer *et al.*, 2009), en rivalisant avec le pathogène pour l'espace et les nutriments (Haas et Defago, 2005), et en chélatant le fer grâce à la production de sidérophores (Ongena *et al.*, 2002).

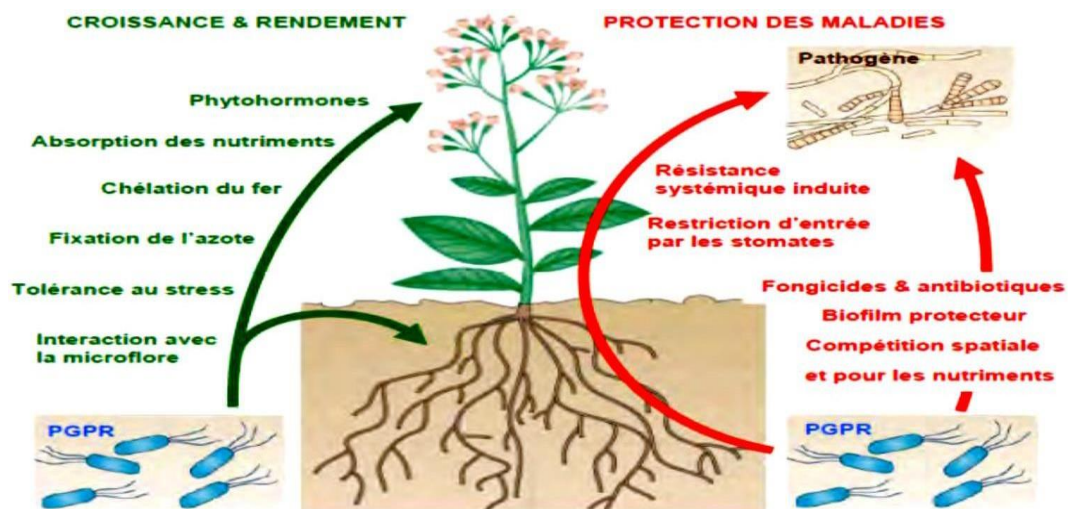


Figure 3 : Les mécanismes d'action des rhizobactéries (Ramos *et al.*, 2009).

Les études montrent de manière concluante que les PGPR sont efficaces aussi bien sur les plantes dicotylédones (telles que pois, concombre, radis, tabac, tomate) que sur les plantes

Monocotylédones (comme le riz, le maïs, la canne à sucre). En général, la protection conférée par les PGPR est de moins longue durée lorsqu'elle est induite par un agent pathogène que lorsque les PGPR sont utilisés.

Les PGPR peuvent être classés en deux groupes principaux en fonction de leur relation avec la plante hôte (Khan et Zaidi, 2005) :

I.3.1.1 Rhizobactéries Non-Symbiotiques

- Les rhizobactéries non symbiotiques qui restent à l'extérieur des cellules des plantes (PGPR extracellulaires telles que *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, etc.).

I.3.1.2 Rhizobactéries symbiotiques: *Rhizobium sp*

Les rhizobactéries symbiotiques, également connues sous le nom de PGPR intracellulaires, se caractérisent par leur capacité à envahir les cellules racinaires. Elles se spécialisent principalement dans un processus appelé "nodulation". Parmi les rhizobactéries les plus étudiées figurent *Rhizobium sp*. (Gray et Smith, 2005).

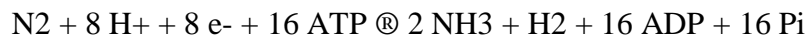
Les rhizobiums sont des bactéries du sol qui appartiennent à la famille des Rhizobiaceae. Ce sont des bactéries à Gram négatif, strictement aérobies, qui ont une forme de bâtonnets et qui ne forment pas de spores. Ces bactéries sont mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire, ou possèdent 2 à 6 flagelles péritriches (voir la Figure). Elles montrent une croissance optimale à une température de 28 °C et à un pH compris entre 6 et 7. On peut trouver les rhizobiums partout dans le monde, associés aux racines des plantes, mais ils sont également présents dans le sol environnant les plantes (Sana Dhane Fitouri, 2011).

I.3.1.2.1 Symbiose fixatrice d'azote

L'azote est l'un des éléments minéraux essentiels qui limite la croissance des plantes, car ses formes assimilables sont présentes en quantité limitée dans le sol. La forme prédominante d'azote sur terre est le diazote atmosphérique, mais seules quelques espèces de procaryotes sont capables de l'utiliser comme source d'azote pour leur nutrition. Les plantes acquièrent l'azote principalement en l'assimilant sous forme d'azote minéral, tel que le nitrate et l'ammonium. Cependant, certaines plantes peuvent également mobiliser l'azote atmosphérique en formant une association symbiotique avec des bactéries fixatrices d'azote (Stougaard, 2000).

I.3.1.2 2 Processus de la Fixation Symbiotique de L'azote Atmosphérique

La fixation d'azote est un processus au cours duquel le N₂ est réduit en NH₃ grâce à l'action du complexe enzymatique de la nitrogénase, comme indiqué dans la réaction suivante (Kaminski *et al.*, 1998) :



Ce processus de fixation d'azote est très énergivore, nécessitant 16 molécules d'ATP pour réduire une molécule de N₂ en NH₃. Le succès de la fixation d'azote repose sur la collaboration des deux partenaires : la plante fournit un environnement microaérobie, de l'énergie et des sources de carbone essentielles pour le fonctionnement de la nitrogénase, tandis que le bactéroïde fournit les gènes *nif* et *fix* responsables de la synthèse de la nitrogénase et essentiels à la fixation d'azote. Les gènes *nif* codent pour la biosynthèse de la nitrogénase (Fisher 1994 ; Newton, 2007), tandis que les gènes *fix* sont spécifiques aux micro-organismes fixateurs symbiotiques (Fisher, 1994 ; Lodwig et Poole 2003 ; Masson-Boivin *et al.*, 2009).

La nitrogénase est très sensible à l'oxygène et s'inactive rapidement dans un environnement aérobie. Cependant, la nodosité, qui est une structure spéciale sur les racines des plantes, lui procure une niche protectrice. La présence de la leghémoglobine, une protéine végétale, dans la nodosité permet de fixer l'oxygène et de maintenir une faible pression partielle d'oxygène. Ainsi, la leghémoglobine régule la diffusion de l'oxygène vers les bactéroïdes, assurant ainsi un environnement favorable à l'activité de la nitrogénase (Ott *et al.*, 2005).

Le nodule représente un nouvel organe formé par la plante hôte, à l'intérieur duquel les bactéries se différencient en bactéroïdes et réalisent la fixation de l'azote atmosphérique. Pour assurer une activité optimale de la nitrogénase, une enzyme très sensible à l'oxygène et qui devient irréversiblement inactive en présence d'oxygène, la plante maintient les nodules dans des conditions de micro-oxie grâce au parenchyme nodulaire. Parallèlement, la leghémoglobine assure le transport et le maintien d'une concentration en oxygène indispensable à la respiration, tout en évitant un excès d'oxygène nuisible à l'activité de la nitrogénase (Ott *et al.*, 2005).

a. Préinfection

La formation du nodule nécessite une étroite collaboration génétique entre la bactérie et la plante (Michelle, 2006). Cette interaction entre les deux partenaires débute dans la

Rhizosphère, où la plante favorise sélectivement la croissance des bactéries (Savka *et al.*, 2002). Les flavonoïdes (Figure 4) présents dans les exsudats racinaires attirent les *Rhizobium* par chimiotactisme et induisent l'expression des gènes nod bactériens responsables de la production des facteurs Nod (FNs). Ces facteurs Nod, à leur tour, induisent des changements morphologiques, physiologiques et moléculaires chez la plante hôte (Perret *et al.*, 2000 ; Mulder *et al.*, 2005 ; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2007 ; Oldroyd *et al.*, 2011).

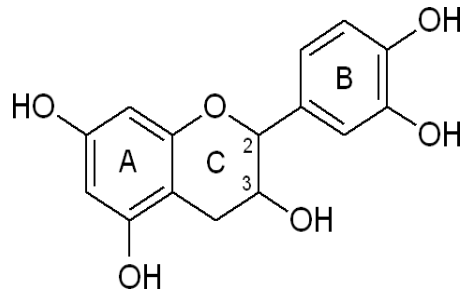


Figure 4 : Structure chimique du Flavonoïde

b. Infection

Deux types d'infection sont distingués : la voie intracellulaire, qui est la plus étudiée, et la voie intercellulaire. Dans le cas de l'infection intracellulaire, la pénétration de la bactérie est facilitée par la courbure du poil racinaire, créant ainsi une zone confinée où la bactérie est entourée par la paroi végétale, formant ainsi une micro-niche propice à la prolifération des bactéries (Figure 5) (Gage, 2004). À partir de ce point, un cordon d'infection est initié par hydrolyse de la paroi (Mateos *et al.*, 2001), invagination de la membrane végétale et production de matériel pariétal par la plante. Ce cordon d'infection prend la forme d'une structure tubulaire qui se développe à l'intérieur de la cellule, permettant ainsi la prolifération de la bactérie (Gage, 2004).

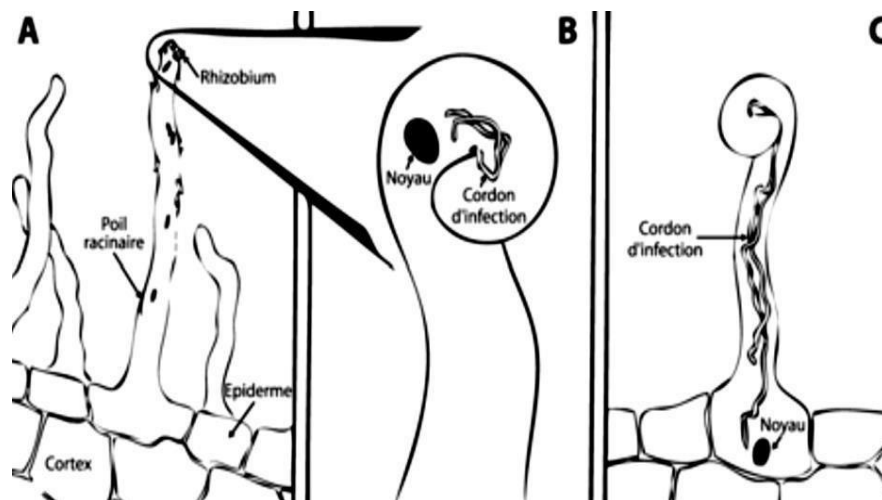


Figure 5: Infection intracellulaire chez les Légumineuses. La bactérie colonise la rhizosphère et entre en contact avec le poil racinaire (A). Les facteurs Nod induisent la courbure du poil racinaire ce qui permet la création d'une zone confinée pour la bactérie qui initie l'infection (B). La mise en place du cordon d'infection suit le déplacement du noyau vers la base du poil (C). D'après Perret et al., 2000.

b. Développement du nodule

En même temps que l'infection progresse, l'organogenèse nodulaire se déroule. Lorsque la plante est infectée par les Rhizobium, cela entraîne la différenciation et la division des cellules du cortex, aboutissant à la formation d'un primordium nodulaire, un lieu où les bactéries sont libérées. Ce primordium nodulaire se transforme ensuite en une nodosité mature. À l'intérieur de la nodosité, la bactérie subit une différenciation pour se convertir en bactéroïdes, une forme sous laquelle elle devient capable de réduire l'azote atmosphérique (N_2) en ammonium (NH_4^+) (Wang *et al.*, 2012).

Chapitre 2

Matériel et méthodes

II.1 Isolement des rhizobactéries

Pour réaliser l'isolement des rhizobactéries à partir de la rhizosphère des plantes de petit pois (*Pisum sativum* L), nous avons récupéré des plantes entière, sol rhizosphérique y compris. Dans des flacons contenant des milieu liquide, nous avons mis 5g de sol de la rhizosphère après agitation, nous avons incubé ces flacons à une température de 28°C pendant 24 heures sous agitation à 150 tr/min.

Une fois l'incubation terminée et à partir de chaque suspension mère nous avons réalisé des séries de dilutions par la méthode de suspension- dilution, puis à l'aide d'une micropipette ; nous avons prélevé 0.1 ml de chaque suspension mère et nous les avons ensemencées a la surface de plusieurs milieux de culture (GN ; KB ; Ashby), une fois les boîtes ensemencent, elles ont été placé à une température de 28°C pendant 24 à 48 heures. Après l'incubation des milieux ensemencés, nous avons procédé à une purification par repiquage successif des colonies bactériennes pour obtenir des souches bactériennes pures avant de commencer le processus d'identification.

II.2 Identification des isolats bactériens

Pour une identification des isolats bactériens nous sont base sur la production du pigment fluorescent et les tests biochimiques et physiologiques L'identification des souches purifiées suit une démarche en plusieurs étapes successives, se basant sur l'analyse et la détermination de divers caractères

II.2.1 Teste biochimique et physiologique

Les tests biochimiques sont des méthodes utilisées pour identifier et caractériser les bactéries en fonction de leurs réactions chimiques et métaboliques.

II.2.1.1 Solubilité en KOH

Le test au KOH (hydroxyde de potassium) est test rapide pour distinguer les bactéries à gram négatifs des bactéries à gram positive.

Nous avons appliqué une goutte de KOH à 3% sur une lame propre et sèche. Et à l'aide d'une pipette Pasteur, prélevez une colonie bien isolée et réparti sur la lame en effectuant un mouvement circulaire régulier.

Après 30 secondes, si la solution prendra une consistance collante et formera une chaîne visqueuse en présence de bactéries à gram négatifs. Et absente en présence de bactéries à gram positive (Suslow *et al.*, 1980).

II.2.1.2 Coloration de Gram

La coloration de Gram représente une méthode fondamentale en bactériologie utilisée pour distinguer les bactéries en deux groupes principaux, les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

Pour préparer le frotti fixe, nous avons déposé une goutte d'eau distillée stérile sur une lame de microscope. Et à l'aide d'une pipette Pasteur, nous avons prélevé et réparti une colonie bien isolée sur la lame en effectuant un mouvement circulaire régulier. Puis nous avons passé la lame dans la flamme du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.

Pour la première étape de coloration, nous avons appliqué une goutte de solution de violet de gentiane sur la lame pour imprégner les cellules bactériennes et laissé agir pendant une minute. Puis nous avons rincé brièvement la lame pour éliminer l'excès de colorant en utilisant de l'eau au-dessus de la préparation. En suit, nous avons appliqué quelques gouttes de solution de lugol et laissé reposer pendant 1 minute Puis nous avons rincé l'eau.

Après un rinçage délicat avec un agent de décoloration de l'alcool pendant 30 secondes (Cette étape élimine le colorant des bactéries à Gram négatif, les rendant plus perméables) ; nous avons appliqué quelques gouttes de solution de fuchsine sur le frottis et laissé agir pendant une minute. Par la suite rincé à l'eau.

Après séchage à l'air ou avec un mouvement délicat. La lecture de la coloration de Gram est basée sur le changement de couleur, où, les germes qui ont gardés la première coloration (coloré par violette) sont des Gram positif. Ceux qui ont été décoloré par l'alcool se présente une couleur rose (coloré par la fuschine) sont des Gram négatif, en utilisant un microscope avec un objectif x 40, ou avec une goutte d'huile à immersion pour un objectif x 100, afin de réaliser l'observation.

II.2.1.3 Croissance en anaérobiose (Test de Hugh Leifson) :

Le milieu de Hugh et Leifson (Annexe1) permet de distinguer entre les deux processus. La dégradation d'un glucide s'accompagne généralement d'une acidification du milieu : lors des respirations le glucide est oxydé en CO₂, par le dioxygène (ou un autre oxydant minéral); Lors

des fermentations le glucide est oxydé en acides, alcools, qui sont libérés dans le milieu qu'ils acidifient sensiblement. Toutes les voies fermentaires ne sont cependant pas également acidifiantes (Schaad *et al.*, 2001).

Nous avonsensemencé les bactéries par piqûre centrale dans un tube d'essai contenant un milieu de Hugh et Leifson puis nous avons ajouté environ 1cm d'huile de paraffine stérile. Laissons les tubes en incubation à une température $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, pendant 24 à 48h.

Le milieu de Hugh et Leifson contient un indicateur de pH. Le bleu de bromothymol qui prend une couleur jaune en milieu acide. Une réaction positive se traduit par obtention de la couleur jaune (Les bactéries oxydent le glucide par respiration. la réaction négative (-) les bactéries inactives ou inertes ne change pas la couleur verte du milieu (fig 8).

II.2.1.5 Test de Mobilité

Le test de mobilité est utilisé pour déterminer si une bactérie est mobile ou non, c'est-à-dire si elle peut se déplacer dans un milieu liquide. Voici les étapes du test :

Nous avons prélevé une colonie bactérienne isolée. À l'aide d'une pipette pasteur, piquez le milieu de culture semi-solide à environ 2/3 de la profondeur du tube. Après incubation à la température appropriée à 30°C pendant 24 à 48 heures. ; si la bactérie est mobile, nous verrons une diffusion de croissance à partir du point d'inoculation. Si la bactérie n'est pas mobile, la croissance restera limitée à l'endroit de l'inoculation.

II.2.1.6 Test de Citrate de Cimone (CIT)

Le test de citrate (CIT) est utilisé pour déterminer si une bactérie est capable d'utiliser le citrate comme source de carbone dans son métabolisme. Dans des tubes de culture contenant le milieu citrate de simmons et à l'aide d'une pipette pasteur stérile nous avons prélevé une petite quantité de culture bactérienne pure. etensemencé doucement la surface du milieu de citrate. Après incubation à la température appropriée à 30°C pendant 24 à 48 heures

Si la bactérie est capable d'utiliser le citrate comme source de carbone, le milieu de culture deviendra bleu en raison de l'augmentation du pH due à la conversion du citrate en bicarbonate. le résultat ainsi est positif, elle est négatif pour utilisation du citrate, si la bactérie n'est pas capable d'utiliser le citrate, le milieu de culture restera vert.

II.2.1.7 Gélose *Triple Sugar Iron* (TSI)

La gélose Triple Sugar Iron (TSI) est utilisée pour étudier les propriétés biochimiques des bactéries. Elle se base sur le test des capacités métaboliques des bactéries en fonction de leur fermentation des sucres (lactose, saccharose, glucose) ainsi que de leur production de gaz et d'acides.

Dans des tubes de culture contenant le milieu de culture gélosé Triple Sugar Iron (TSI) et à l'aide d'une pipette pasteur stérile nous avons prélevé une petite quantité de culture bactérienne pure et ensemencé doucement la surface du milieu (TSI). Après incubation à la température appropriée à 30 °C pendant 24 à 48 heures. Les résultats du test sont lus en examinant plusieurs caractéristiques :

- Rouge : indique une fermentation des sucres avec production d'acides.
- Tout le tube jaune : indique une fermentation des trois sucres (glucose, lactose, saccharose).
- Rouge dans la partie supérieure et jaune dans la partie inférieure : indique une fermentation du glucose uniquement.
- Fissures ou décollement du milieu : indiquent une production de gaz.
- Jaune avec une fissuration du milieu : indique une forte production de gaz.

II.2.1.8 Test Cystine

La cystine est un acide aminé sulfuré qui peut être détecté et quantifié à l'aide de diverses méthodes de test.

Nous avons ensemencé quelques gouttes de suspension bactérienne à l'aide d'une micropipette. Dans des tubes de culture contenant le milieu liquide. Après incubation à la température appropriée à 30 °C pendant 24 à 48 heures, l'observation d'une coloration jaune ou marron indique un résultat positif pour la présence de cystine. L'absence de changement de couleur indiquerait un résultat négatif.

II.2.1.9 Galerie API 20 NE

La galerie API 20 NE (bio Mérieux SA) est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc), combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données.

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

Nous avons appliqué la galerie API 20NE, pour 5 isolats bactériens choisis aléatoirement de notre collection, Pour sa réalisation nous avons suivi le protocole et les institutions du producteur bio Mérieux.

a. Préparation des inoculums

Sur un tube d'essai contenant 5 ml d'eau physiologie stérile, nous avons prélevé des colonies bactériennes jeunes bien isolées sur un milieu gélosé (KB), ensuite homogénéisé soigneusement avec le vortex pour réaliser la suspension bactérienne (A).

La suspension bactérienne (B) a été préparée en mettant 200µl de la suspension bactérienne (A) dans l'ampoule du milieu AUX ; l'homogénéisation a été faite à l'aide d'une pipette pasteur.

b. Inoculation de la galerie

Premièrement, nous avons réparti l'eau distillée stérile dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Ensuite, nous avons rempli avec la suspension bactérienne (A) les micr-tubes (et non les cupules), des tests NO₃ jusqu'à PNPG, Pour les tests : ADH, GLU, URE, nous avons créé une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine stérile.

Avec la suspension bactérienne (B), nous avons rempli les micr-tubes et les cupules des tests GLU jusqu'à PAC. A la fin, nous avons refermé les plaques et les incubés à la température 29±2°C pendant 24 h jusqu'à 48h.

La lecture de ces réactions se fait en se référant au tableau de lecture (Annexe). Après incubation, la révélation des deux tests NO₃ et TRP doit se faire juste avant la lecture des résultats en ajoutant les réactifs correspondant pour chaque test. Pour le test TRP une goutte de réactif JAMES est ajouté dans le micr-tubes, et les deux réactifs NIT 1 +NIT 2 et/ou Zn

II.2.1.10 Sensibilité des souches isolées au pH

Dans des boites des Pétri contenant le milieu (TSA) à différent Ph (5 ;6 ;7 ;8 ;9), nous avonsensemencé les isolats bactériens testés, ces isolats ont été incubé à la température (28 ±2°C),

II.2.1.11 Sensibilité des souches isolées à la température

Dans des boites des Pétri contenant le milieu (TSA), nous avonsensemencé les isolats bactériens, ces isolats ont été incubé à la température (30 ; 37 et 41±2°C),

II.2.1.12 Test d'hypersensibilité

Le test d'hypersensibilité de la plante de tabac, également connu sous le nom de test HR (réaction d'hypersensibilité), est une méthode couramment utilisée pour évaluer la réponse immunitaire d'une plante à une infection par une pathogène. Ce test permet de déterminer si une plante présente une réaction de défense rapide et localisée en réponse à une infection.

Nous avons préparé une suspension bactérienne suffisamment concentrée de l'isolat testé pour provoquer une infection, à l'aide d'une seringue, nous avons inoculé l'espace intracellulaire le long de la nervure centrale de la face inférieure de feuille de Tabac, après 24 à 48 heures d'inoculation, l'apparition des signes visibles de réaction hypersensible, tels que le développement de lésions nécrotiques (zones mortes) à l'emplacement de l'inoculation.

II.3 Recherche des activités enzymatique

La recherche de l'activité enzymatique de bactéries dans différents milieuxensemencés avec des bactéries peut aider à étudier comment les bactéries réagissent aux différentes sources de substrats et aux conditions environnementales, en fonction des réactions enzymatiques spécifiques.

a. Lipase : Les lipases dégradent les lipides (graisses) en glycérol et en acides gras.

Nous avons ensemencé par les méthode de spot les isolats bactériens sur le milieu des culture dont la composition (g l^{-1}): peptone 10.0, NaCl 5.0, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1, agar 18.0, pH 7.4, additionné avec tween 80 1% (v/v) Sierra (1957), après incubation les boîtes à une température optimale pour l'activité de la lipase pendant 24 à 48h, et observé si le lipide a été dégradé en glycérol et en acides gras par l'apparition d'un halo au tour des spots bactériens.

b. Amylase : Les amylases hydrolysent les glucides complexes, comme l'amidon, en sucres simples tels que le glucose.

Nous avons ensemencé par la méthode de spot les isolats bactériens sur le milieu des culture GN contenant de 2% d'amidon soluble. Après incubation les boîtes à une température optimale pour l'activité de la lipase pendant 24 à 48h, a été démontrée en inondant les boîtes avec du lugol ; l'apparition de la zone claire formée autour de la colonie révèle la présence de l'enzyme

c. Phosphatase : Les phosphatases catalysent la déphosphorylation, c'est-à-dire le retrait d'un groupe phosphate d'une molécule.

La capacité de solubilisation des phosphates des bactéries isolées est testée selon la méthode décrite par Nautiyal (1999) sur un milieu NBRIP (Annexe 1) contenant 0,5% de phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) comme source de phosphate insoluble (Pikovskaya, 1948).

Nous avons ensemencé des isolats bactériens sont déposés en spot à la surface du milieu solide. La capacité de solubilisation est évaluée par la formation d'un halo transparent autour de la colonie. Après 7 jours d'incubation, le diamètre du halo de solubilisation est déterminé en soustrayant le diamètre de la colonie du diamètre total.

d. Cellulase

Nous avons ensemencé par la méthode de spot les isolats bactériens sur le milieu de culture (extrait de levure, 0.1g ; peptone 0.5 g ; agar, 16 g et eau distille, 1000 ml) contenant 0.5% Na-carboxymethyl cellulose (CMC). Après incubation les boîtes à une température optimale pour l'activité de la cellulase pendant 48h, et observé si le matériau cellulosique a été dégradé en composés plus simples l'apparition d'un halo au tour des spots bactériens après l'addition du Rouge Congo et 1M NaCl.

e. Protéase : Les protéases décomposent les protéines en peptides plus petits.

Nous avons ensemencé par la méthode de spot les isolats bactériens sur le milieu de culture GN contenant. Après incubation les boîtes à une température la température 28°C de la cellulase pendant 48h, et observé si le matériau cellulosique a été dégradé en composés plus simples l'apparition d'un halo au tour des spots bactériens après l'addition du rouge Congo et NaCl.

f. Pectinase : Le test pectinase est un teste utilisé pour tester la capacité de dégradation de pectine par des isolats bactéries.

Nous avons désinfecté des tubercules de pomme de terre, par l'éthanol pure, puis l'eau de javel 3%, suivie par 3 rinçages successive à l'eau distillée stérile, et coupé en disque de 7mm de hauteur puis réalisé un petit trou circulaire sur la surface de chaque cercle de pomme de terre, sans le traverser complètement.

Nous avons placé les cercles de pomme de terre ainsi préparés sur un morceau de papier absorbant stérile (pour maintenir un environnement humide) dans des boîtes de Pétri. À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, Nous avons prélevé une colonie bactérienne bien isolée pour préparer une suspension bactérienne, puis transféré 100µl de la suspension bactérienne délicatement dans la partie de la pomme de terre percée, en évitant de contaminer les autres parties, en fin fermé hermétiquement les boîtes de Pétri pour éviter toute contamination extérieure L'incubation a été effectuée à une température de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 10 à 14 jours. La réaction est considérée positive par l'apparition de pourriture qui s'accompagne d'une forte odeur (Cooksey et *al.*, 1990).

II.4 Activité antifongique par confrontation directe *in vitro*

Sur des milieux de culture requis pour les bactéries et les champignons (KB, TSA), nous avons déposé des cultures pures des isolats à tester en spot à une distance de 2 cm du centre. Après de 48 heures d'incubation à une température de 28°C ; nous avons déposé un disque de 0.6 cm des cultures pures des champignons (*Fusarium graminearum* ; *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ; *Fusarium culmorum* ; et *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*) au centre des boîtes de Pétri ensemencé par les bactéries ainsi que dans des boîtes témoin ne contenant que le

mycélium fongique. Après de 5 jours d'incubation ; nous avons mesuré la croissance du champignon à l'aide d'un pied à coulisse.

L'évaluation du taux d'inhibition du champignon testé est estimée selon la formule suivant (Wang et al 2002) :

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

R témoin = résultats obtenus par le champignon.

R test = résultats obtenus par l'antagoniste.

II.4.1 Dispositif expérimentale

Pour l'essai de l'antagonisme *in vitro*, nous avons opté pour un dispositif en randomisation totale à quatre facteurs étudié et deux répétions pour chaque champignon testé :

✚ **Facteur 01** : correspond aux souches bactériennes avec huit niveau (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8).

✚ **Facteur 02** : correspond au milieu de culture avec quatre niveau (KB, TSA).

Les traitements en question sont :

- **T1 ; T3 ; T2 ; T4 ; T5 ; T6 ; T7 ; T8** : correspondant respectivement aux isolats bactériens testés (B2 ; B4 ; B5 ; B6 et B8) sur le milieu de culture (KB).
- **T9 ; T10 ; T11 ; T12 ; T13 ; T14 ; T15 ; T16** : correspondant respectivement aux isolats bactériens testés (B2 ; B4 ; B5 ; B6 et B8) sur le milieu de culture (TSA).

II. 5. Activité PGPR

L'activité des PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) se réfère à la capacité de certaines bactéries bénéfiques qui vivent dans la zone racinaire des plantes (rhizosphère) à favoriser la croissance, le développement et la santé des plantes hôtes.

a. Activité Acide indol acétique AIA

Dans un milieu de culture liquide (LB) additionné de 200 µg/ml de tryptophane de nous avons ensemencé des suspensions bactériennes des isolats testés. Puis agité soigneusement jusqu'à obtenir une homogénéité visuelle. Après incubation de 96 heures à une température de 28°C sous agitation 120 rpm (Leveau et *al.*, 2005). Et une centrifugation à 4500 rpm pendant 20 min. À l'aide d'une micropipette, nous avons transféré 1 ml du surnageant dans un autre tube propre. Et ajouté ensuite 2 ml du réactif Salkowski (1ml de FeCl₃.6H₂O 0.5 M dans 50 ml de l'acide perchlorique à 35%). Après 30 minutes à température ambiante pendant environ à l'obscurité. Si l'acide indol acétique (AIA) est présent, une coloration rose à rouge apparaîtra. Pour mesurer l'absorbance, utilisez un spectrophotomètre UV-Vis en réglant la longueur d'onde à environ 530 nm. Utilisez le solvant d'extraction comme blanc de référence lors de la mesure.

b. Activité de l'acide cyanhydrique (HCN)

À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, nous avons prélevé une colonie bactérienne bien isolée puis ensemencé les bactéries sur le milieu TSA additionné de glycine (4.4 g/l). Nous avons placé un morceau de papier Whatman n°1 imprégné du réactif (5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium) à l'intérieur du couvercle de chaque boîte de Pétri, puis fermé hermétiquement ces boîtes et incubées inversées à 28°C pendant 4 jours. Si les bactéries produisent de l'HCN, le papier vira de la couleur jaune vers le brun clair ou rouge brun.

c. Activité Ammoniac (NH₄⁺)

Nous avons inoculé 100 µl de la suspension bactérienne à tester dans un tube à essai contenant du milieu eau peptonée. Après incubation Incubez les à 30 °C pendant 48 heures, l'addition de 0.5 ml du réactif de Nessler donnant une couleur jaune à marron indique la production de NH₃ (Cappuccino et Sherman, 1992).

II.6. Essai de biocontrôle de *Fusarium oxysporum f.sp. pisi* in vivo

L'essai a été mené, en impliquant une variété petit pois (*Pisum sativum* L). Cette essai a été examiné l'interaction entre cinq isolats bactériens B2, B4, B5, B6 et B8, ainsi qu'un type spécifique de champignon *Fusarium oxysporum f.sp. pisi* L'objectif était d'évaluer le niveau de résistance des plantes face à ces interactions.

II.6. 1. Bactrisation et contamination de la semence

Les semences subissent une désinfection en les immergeant dans une solution de HgCl₂ (0,1 %) pendant 30 minutes à température ambiante. Ensuite, elles sont soumises à cinq rinçages successifs avec de l'eau distillée stérile, chaque rinçage durant 5 minutes. Les semences sont ensuite immergées dans la suspension bactérienne pendant une durée de 3 heures, sauf le témoin dans l'eau distillée stérile. Après le trempage et le séchage des graines sur papier absorbant, les graines distinguées à l'inoculation par FOP sont pulvérisées par la suspension fongique.

II.6.2. Dispositif expérimentale

Après préparation de la semence testée, puis nous les avons mis dans des boîtes stériles en plastique transparent de (250 ml) contenant sable stérile humidifié par l'eau distillé stérile ; à raison de 6 graines par boîte. Le dispositif utilisé est une randomisation totale, représenté par l'interaction de deux facteurs :

- Facteur 1 : correspond à la bactérisation à six niveaux (les cinq isolats B2, B4, B5, B6 et B8) et le témoin non bactérisé
- Facteur 2 : représente champignon pathogène à deux niveaux (contaminé par le FOP et non contaminé par le FOP).

Les traitements en question sont :

- **T1** (témoin négatif) : Semence n'est pas traité par suspension bactérienne et ni traité par suspension fongique (FOP).
- **T2 (témoin positif)** : Semence n'est pas traité par suspension bactérienne et traité par suspension fongique(FOP).
- **T3, T4, T5, T6, T7** : Semence traité par la suspension fongique (FOP) et traité respectivement par les suspensions bactériennes (B2 ; B4 ; B5 ; B6 et B8).
- **T8, T9, T10, T11, T12** : Semence n'est pas traité par la suspension fongique (FOP) et traité respectivement par les suspensions bactériennes (B2 ; B4 ; B5 ; B6 et B8).

II.6.3. Paramètres mesurés

Le suivi du comportement des graines de *Pisum sativum* L. a été réalisé en se basant sur divers paramètres morphologiques tout au long du processus de germination.

a. Taux de germination

Après 24h de la mise en boîtes, nous avons réalisé des observations visuelles des graines germées, puis nous avons procédé à la notation des graines germé, jusqu'à le septième jour, (Hultberg et al, 2000).

Le taux de germination est calculé par la division des graines germé sur le nombre total des graines fois cent Selon l'équation suivante :

$$TG (\%) = \frac{\text{nombre des graines germiné}}{\text{nombre totale des graines}} \times 100$$

b. Détermination de la longueur des racicules et la tige

Après une période de 15 jours, la mesure de la longueur des racicules et la tige est effectuée en utilisant une feuille millimétrée (en centimètres).



Figure 6 : la mesure de la longueur des plantules

c. Indice de vigueur

Indice de vigueur est calculé par l'addition du moyen de la longueur des racicules et la longueur des feuilles multiplier par le taux de germination. Selon l'équation suivante :

$$IV = (\text{Moyen longueur des racicules} + \text{moyen longueur de la tige}) \times \text{Taux de Germination.}$$

II.7. Analyse statistique

Pour les deux essais, l'essai de l'activité antifongique par confrontation directe *in vitro* et l'essai de biocontrôle de *Fusarium oxysporum f.sp. pisi in vivo*, Une analyse de variance était effectué à l'aide du logiciel Stat Box végétale (version 6.9) a été réalisée en considérant l'essai aléatoire ($\alpha = 5\%$). La mise en évidence de différences significative concerne l'effet de chaque facteur contrôlé (Facteur1 et Facteur2) ; et de leur interaction (F1xF2). L'analyse est complétée par le test de Newman et Keuls lorsqu'une variation significative avec un seuil d'erreur de 5 % a été révélée. Avec ce test, nous avons effectué la comparaison des moyennes.

Chapitre 3

Résultats et discussion

II.1. Résultats

A partir des cultures bactériennes issues des isollements réalisés à partir de la rhizosphère des plantes de petit pois (*Pisum sativum* L), nous avons obtenu une quarantaine d'isolats isolés sur les différents milieux de culture GN ; KB ; et Ashby, choisis d'une observation à l'œil nu selon les caractères morphologiques des colonies bactériennes.

Après la purification des isolats bactériens sur le milieu de KB, nous avons gardé qu'une dizaine d'isolats, pour les identifier nous avons réalisé les tests biochimique et physiologique voir le test de gram, test de Hugh Leifson, etc.

III.1.1 Identification des isolats bactériens

Après l'isolement des rhizobactéries à partir de la rhizosphère de petit pois et purification, nous gardé les isolats suivants : I1 ; I2 ; I3 ; I4 ; I5 ; I6 ; I7 ; I8 ; I21 et NSI.

III.1.1.1 Test KOH

Après le test de KOH, nous avons observé obtenu une réaction négative car la solution reste claire, transparente et non visqueuse après avoir ajouté la potasse à la culture bactérienne, Ces résultats suggère que les parois cellulaires des bactéries sont épaisses et ne permettent pas à la potasse de les traverser. Cela indique une réaction négative et nous avons observé obtenu aussi une réaction positive car la solution devient visiblement visqueuse, glissante ou gélatineuse après l'ajout de la potasse à la culture bactérienne, cela indique une réaction positive. et suggère que la potasse a réussi à lyser les parois cellulaires fines des bactéries à Gram négatif. En conséquence, pour les isolats testées nous avons quatre qui sont probablement des Gram négatif, et six ont probablement des Gram positif (Tableau 1).

III.1.1.2 Coloration de Gram

Après coloration de Gram nous avons confirmé les résultats du test KOH, dont six sont des Gram négatif par leurs couleur rose et quatre sont des Gram positif par leur couleur violet, leurs varie entre la forme bacille et Cocci (Tableau 1)

III.1.1 3 Test de Mobilité

Après incubation à la température à 30 °C pendant 24 à 48 heures. Nous avons observé la propagation des bactéries à partir du point d'inoculation dans le milieu semi-liquide, cela indique que les dix isolats testés sont mobiles (Tableau 1, **Figure7**).



Figure 7 : Résultats du test mobilité

III.1.1.4 Test de Citrate de Cimon (CIT)

Après incubation, nous avons observé que pour l'isolats (I1 ; I2 ; I8) la gélose reste inchangée en termes de couleur et qu'aucune croissance bactérienne n'est observée, cela indique que ces isolats testés sont incapables d'utiliser le citrate comme source de carbone, ce sont des citrates négatifs. Alors que pour les isolats (I3 ; I4 ; I5 ; I6 ; I7) un changement de couleur de la gélose de vert à bleu, cela indique que la bactérie a utilisé le citrate comme source de carbone ; ce sont des citrate positive (Tableau 1, **Figure 8**).

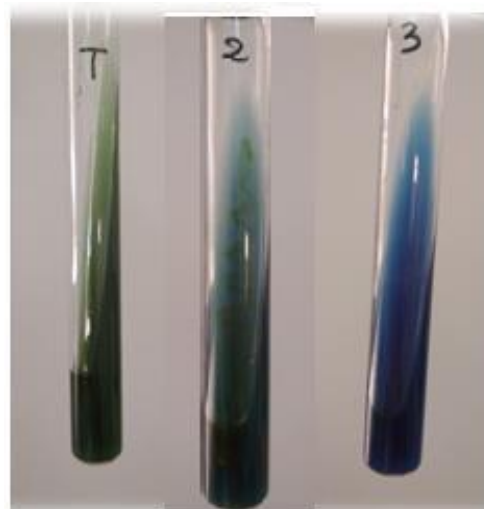


Figure 8 : Résultats du Test de Citrate de Cimon (CIT)
(T) Témoine non ensemencé ; (I2) réaction positive
(I3) réaction positive

III.1.1.5 La gélose *Triple Sugar Iron* (TSI)

Après incubation, nous avons observé que l'isolat (I1) ne fermentent pas les sucres, en absence de production de gaz. (Réaction alcaline/alkaligène). Alors que les isolats (I2 ; I3 ; I4 ; I5 ; I6 ; I7 ; I8) fermentent les sucres (glucose et lactose) avec production de gaz. (Réaction acide/acidogène) (Tableau 1, **Figure 9**).

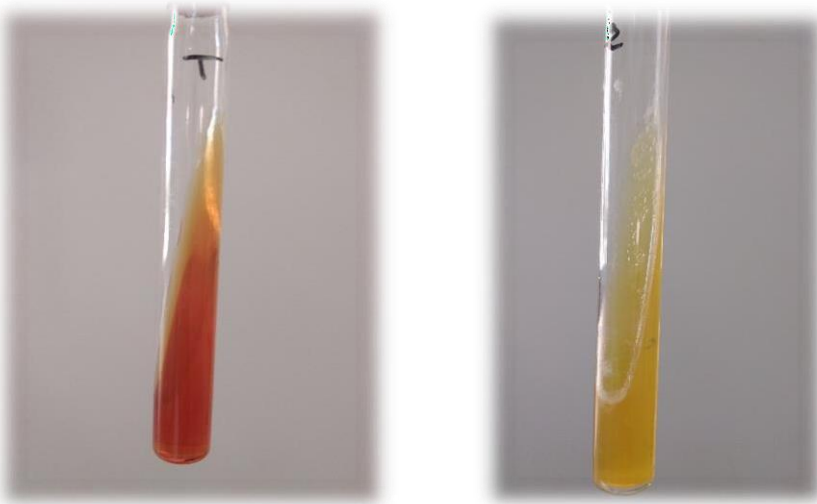


Figure 9: résultats du test TSI
(T) Témoin non ensemencé ; (I2) réaction positive

III.1.1.6 Test d'hypersensibilité

L'interprétation des résultats du test d'hypersensibilité de la plante de tabac dépend de la présence ou de l'absence de la réaction d'hypersensibilité (HR) induite par l'isolat inoculé. Sachant qu'une HR positive signifie que la plante a identifié le pathogène comme une menace et a activé une réponse immunitaire locale pour tenter de limiter la propagation du pathogène alors qu'une HR négative indique que la plante a des mécanismes de défense efficaces qui empêchent l'isolat de causer des dommages importants.

Pour les isolats (I1 ; I2 ; et I5), nous avons observé l'apparition des symptômes d'HR autour de la zone d'inoculation, tels que la nécrose locale (noircissement), la formation de lésions ou la nécrose en anneau, cela indique que la plante de tabac est sensible au isolat inoculé.

Pour les isolats (I3 ; I4 ; I6 ; I7 ; I8) aucune réaction d'HR n'est observée, cela suggère que la plante de tabac est résistante au isolat inoculé (Tableau 1, **Figure 10**).

Tableau 1 : Teste biochimique et physiologique

Les souches	1	2	3	4	5	6	7	8	21	NS I
Coloration de Gram	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
KOH	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
forme	nd	B	C	B	C	B	C	C	C	B
Test de Hugh Leifson	+	+	+	-	+	-		+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cimon de citrate	-	-	+	+	+	+	+	-	nd	nd
TSI	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
hypersensibilité	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-

(+) Réaction positive ; (-) Réaction négative ; B : Bacille ; C : Cocci ; nd : non donné



Figure 10 : résultats du test d'hypersensibilité
(A) Réaction négative (B) réaction positive

III.1.1.7 Galerie API 20 NE

Les la galerie API 20 NE a été utilisé comme des tests individuels (8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation) pour compléter les test l'identification biochimique, les résultats sont représenté dans le (tableau 2 Figure 11)



Figure 11: Photo représentant les résultats de l'identification biochimique d'une galerie API 20NE.

Tableau 2 : Résultats de l'identification biochimique des isolats obtenues en utilisant la galerie API 20 NE.

	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	1H	4H	7H
NO3	+	+	+	-	+	(-)+	+	+	+	+	+
TRP	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	-	+	-		+	(-)+	+	-
ADH	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
URE	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL	(+)-	-	-	-	-	-	+	-	(-)+	-	+
PNG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
GLU	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
ARA	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
MNE	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
MAN	+	+	-	+	+	+	-		+	+	-
NAG	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
MAL	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
GNT	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
CAP	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
ADI	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
MLT	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
CIT	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
PAC	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-

(+) Réaction positive ; (-) Réaction négative

III.1.1.8 Sensibilité des souches isolées à la température

Selon les résultats obtenus, la température a un effet notable sur la croissance des isolats bactérien (I1 ; I2 ; I21 ; NSI), cette dernière diminuée lorsque la température augmente alors que pour les isolats (I3 ; I4 ; I5 ; I6 ; I7 ; I8) n'ont révélé aucune perturbation de croissance en fonction de la température (Tableau 3).

Tableau 3 : Effets de la température sur la croissance bactérienne

Les isolats	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I21	NSI
30 °C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
37°C	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
40°C	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++

(+++) Forte croissance ; (++) croissance moyenne ; (+) Faible croissance.

III.1.2. Activité PGPR

a. Activité Acide indol acétique (AIA)

Dix isolats sont testés pour leurs capacité de produire d'Acide indole acétique (AIA), parmi eux les isolats (I2 ; I3 ; I4 ; I7 ; I8 ; NST) qui ont produit AIA dans le milieu de culture KB en présence du tryptophane (Tableau 4).

b. Activité de l'acide cyanhydrique (HCN)

Dix isolats sont testés pour leurs capacité de produire de l'HCN. La production d'HCN varie considérablement d'une souche à l'autre. L'isolat1 semble être la plus performante en production d'HCN, ce qui se manifeste par un changement de couleur du papier filtre vers une teinte orangée à jaune foncé. Cependant, les autres isolats testés ne produisent d'HCN car aucun changement de couleur est observé (Tableau 4, **Figure 12**).

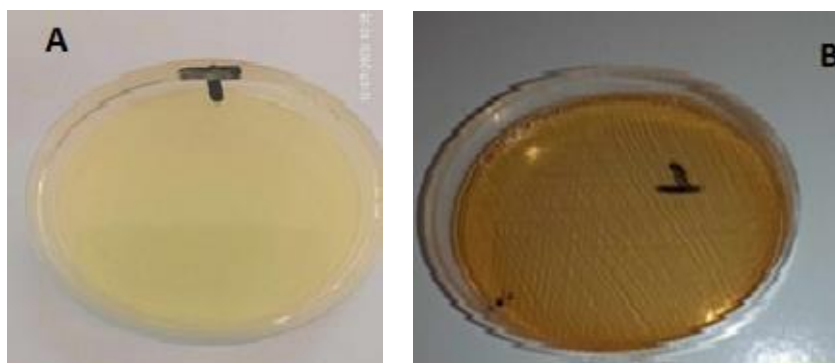


Figure 12 : Résultats de l'isolats productrice d'HCN (A) Témoin ; (B) réaction positive

c. Activité Ammoniac (NH₄⁺)

Dix isolats sont testés pour leurs capacité de produire de l'ammoniac (NH₄⁺). L'ensemble des isolats testés produisent NH₄⁺ a l'exception de l'isolat (I1). L'isolats I21 semblent être la plus performante en production de l'ammoniac (NH₄⁺), La production est très variable d'une souche à une autre (Tableau 4).

Tableau 4 : Production AIA ; (NH₄⁺) ; d'HCN par les isolats bactériens

Isolats	1	2	3	4	5	6	7	8	21	NSI
AIA	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
NH₄⁺	-	++	++	++	++	++	+	++	+++	++
HCN	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-

AIA : Acide indole acétique ; **NH₄⁺** : Ammoniac ; **HCN** : acide cyanhydrique ; (+) activité positive ; (-) activité négative ; (+++) Forte activité ; (++) activité moyenne ; (+) Faible activité.

III.1.2 Recherche des activités enzymatiques

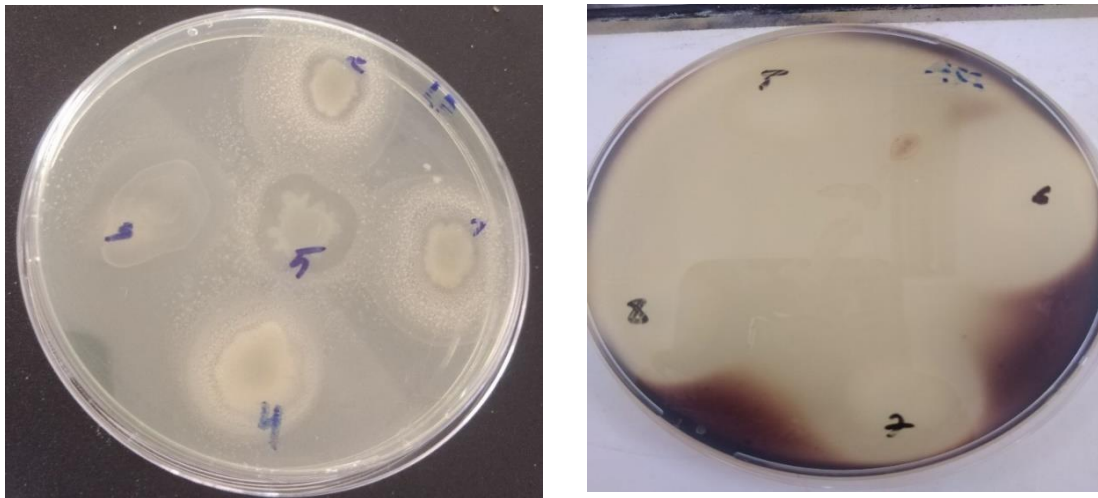
Huit isolats ont subi des tests pour la recherche d'activité enzymatique voir lipase ; amylase ; phosphatase ; cellulase. Une 'activité enzymatique se manifeste par un changement mesurable dans le milieu de réaction, tel qu'un changement de couleur, une production de gaz, une modification du pH ou un précipité, cela suggère généralement la présence d'une activité enzymatique. Ce changement est souvent le résultat de la réaction catalysée par l'enzyme.

Pour nos résultats les huit isolats produisent le lipase et l'amylase, pour le phosphatase l'ensemble des isolats le produisent à l'exception des isolats (I1 et I8), mais ils ne produisent pas le cellulase (Tableau 5, Figure 13).

Tableau 5 : Résultats de 'activité enzymatique des isolats testés

souches	Lipase	Amylase	phosphatase	cellulase
I1	+	+	-	-
I2	+	+	+	-
I3	+	+	-	-
I4	+	+	+	-
I5	+	+	+	-
I6	+	+	+	-
I7	+	+	+	-
I8	+	+	-	-

(+) activité positive ; (-) activité négative



Lipase

Amylase

Figure 13 : Résultats de l'activité enzymatique des isolats testés

III.1.3 Activité antifongique par confrontation directe *in vitro*

Les résultats de test d'antagonisme *in vitro* des huit isolats bactériens, vis-à-vis de quatre espèces. *Fusarium graminearum* (FG); *Fusarium culmorum* (FC); *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, (FOL); *Fusarium oxysporum f. sp. Pisi* (FOP), a été réalisé sur deux différents milieux de culture King B et TSA pour la confrontation directe. (I2, I4, I5, I6, I8)

L'analyse de variance (Annexe 4), a révèlè une différence très hautement significatifs pour les deux facteurs étudié ($P : 0,000$), vis-à-vis de (FG) les isolats I8, I5, I4, I1, I3 sur le milieu TSA et l'isolat I3 sur le milieu KB ont présenté une activité inhibitrice notable et nettement supérieur avec des moyennes qui varie entre 63.27 et 66.67% , classé dans le groupe homogène (a), vis-à-vis de (FOL) l'isolat I3 sur le milieu KB a enregistré le meilleur taux d'inhibition avec une moyenne de l'ordre de 64.10% classé dans le groupe homogène (a),. Vis-à-vis de (FC) les isolats I2 et I3 sur le milieu TSA et l'isolat I4 sur le milieu KB ont enregistré les meilleurs taux avec des moyennes qui varient entre 63.33 et 64.50% classé dans le groupe homogène (a), vis-à-vis de (FOP) l'isolat I3 sur le milieu KB a enregistré le taux d'inhibitions avec une moyenne de l'ordre de 66% qui a été classé dans le groupe (a) les autres isolats ont été classé dans le groupe (ab) à l'exception des isolats I6 et I2 (Figure 13 ;14).

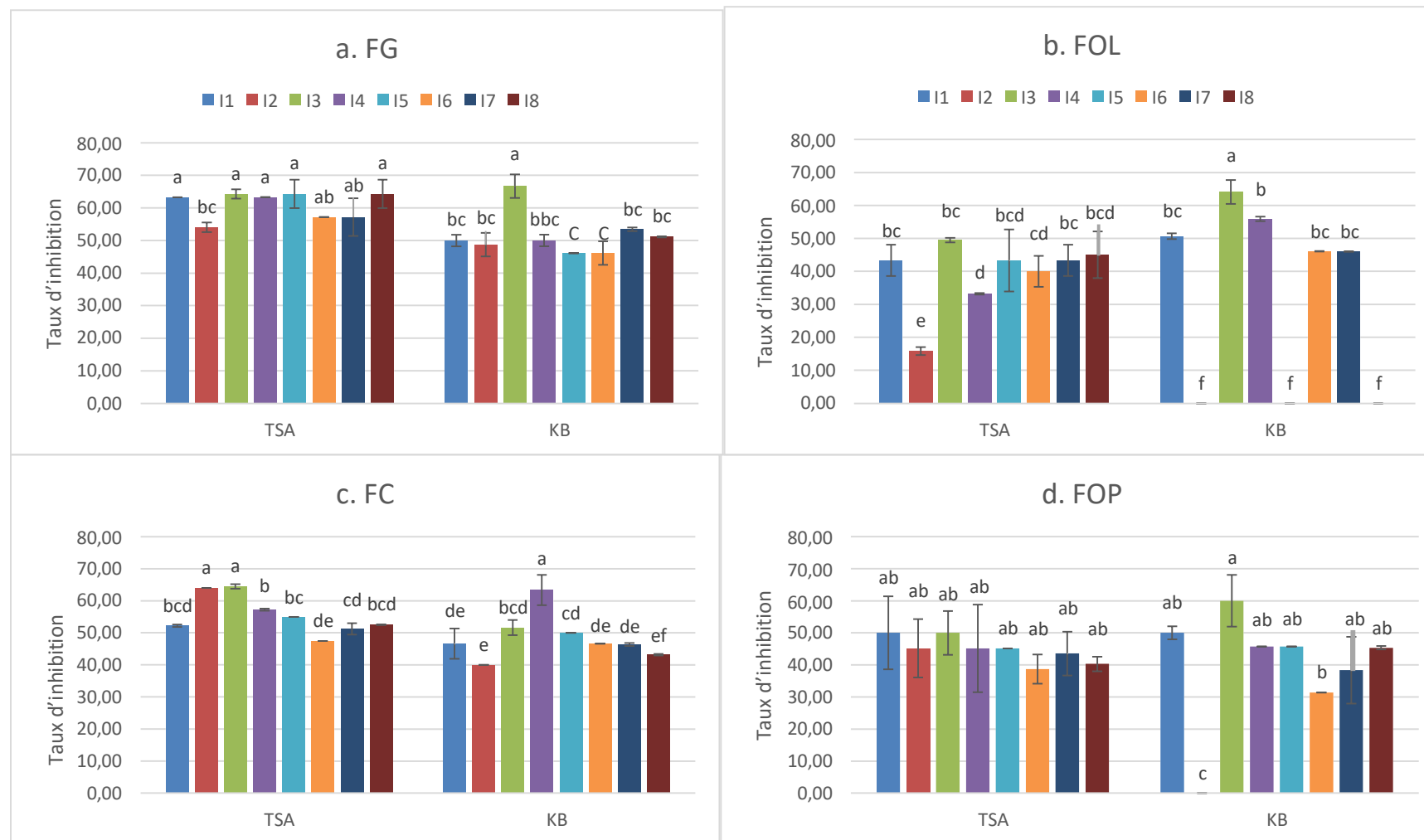


Figure 14 : Taux d’inhibition des souches bactériennes contre les souches fongiques (FG, FOL, FC, FOP) sur les milieux TSA et KB

Les valeurs suivies de la même de la lettre appartient au même groupe homogène, selon le test de Newman-keuls ($\alpha = 5\%$).

a. FG *Fusarium graminearum*; b. FOL. *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* ; FC *Fusarium culmorum*; d. FOP *Fusarium oxysporum f. sp. Pisi*

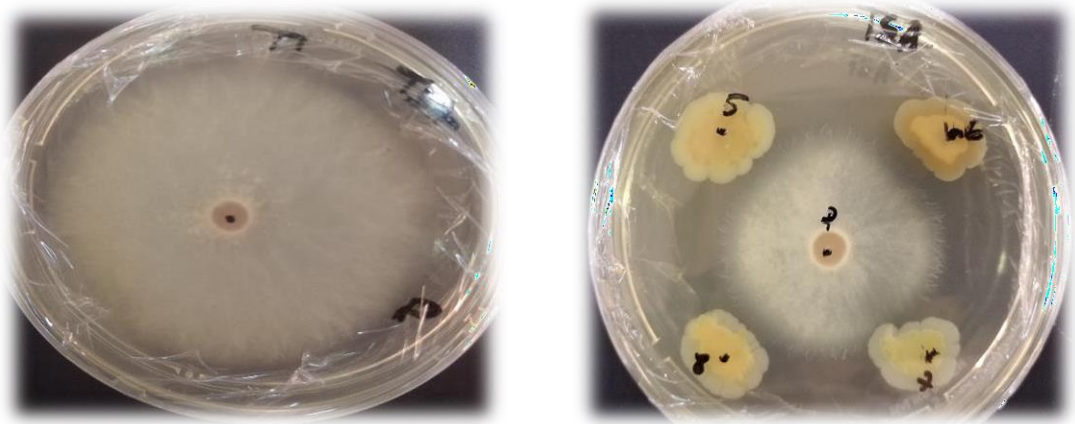


Figure 15 : Inhibition de la croissance mycélienne par confrontation directe.

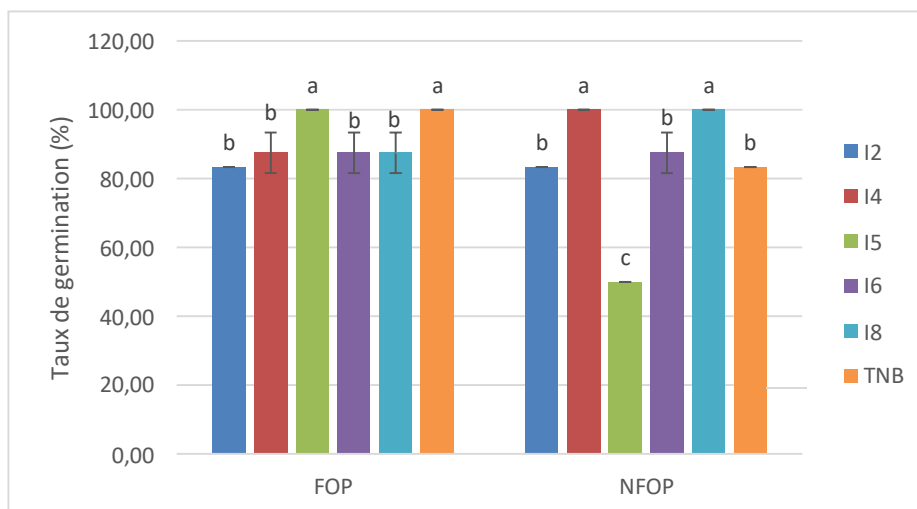
III.1. 4. Les résultats relatifs à l'essai de biocontrôle de *Fusarium oxysporum f.sp. pisi in vivo*

Les résultats représentés dans cette partie sont issus des essais effectués pour mettre en évidence l'effet bénéfique des rhizobactéries isolées de la rhizosphère des plantes de petit pois (*Pisum sativum* L), pour le biocontrôle de *Fusarium oxysporum f.sp. pisi in vivo* et la biostimulation de la germination des graines de petit pois en sa présence.

L'analyse de la variance réalisée sur les résultats obtenus a montré des différences très hautement significatives pour l'ensemble des paramètres étudiés. Exception faite pour le facteur suspension fongique est non significatif ($P = 0,481$) pour le paramètre indice de vigueur.

III.1. 4.1. Effet sur le taux de germination (TG)

L'analyse de variance (Annexe 4), a révélé une différence très hautement significative pour les deux facteurs étudiés et leurs interactions ($P : 0,000$). Selon les résultats sur la figure 15, le taux de germination est variable. Pour les isolats I5 et TNB en présence FOP et les isolats I8, I2 en son absence ont enregistré le meilleur taux de des moyennes qui varient entre 100 % et classé dans le groupe homogène (a). Dans le groupe (b) ; sont classés les isolats I8, I4, I2 en présence FOP et I2, I4, TNB en son absence avec des moyennes qui varient entre 87.50 et 83.33 %. L'isolat I5 absence de FOP a enregistré le plus faible taux de l'ordre 50 %, classé dans le groupe homogène (c).



Les valeurs suivies de la même de la lettre appartiennent au même groupe homogène, selon le test de Newman-keuls ($\alpha = 5\%$).

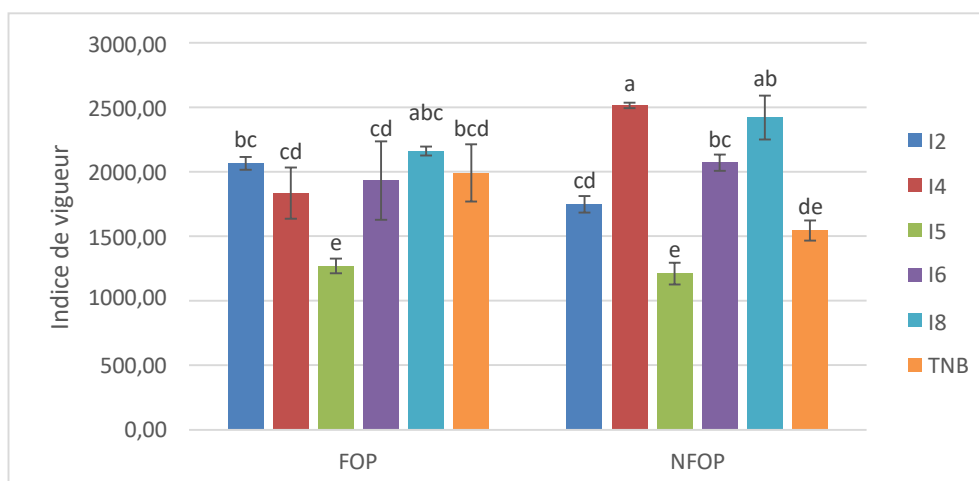
I2, I4, I5, I6, I8: isolats bactériens testés TNB : témoin non bacterisé

FOP : *Fusarium oxysporum* f. sp. *Pisi*; N FOP : Pas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Pisi*

Figure 16 : Effet du l’interaction du facteur bactérisation et le facteur suspension fongiquesur le taux de germination (%)

III.1. 4.2. Effet sur l'indice de vigueur

L’analyse de la variance a donné une différence très hautement significative. Selon les résultats sur la figure 16 de l’indice de vigueur, dans l’interaction de l’isolats I2 en absence de FOP a enregistré la meilleure moyenne de 2525 qui est classé dans le groupe homogène (a), suivi l’isolats I4 en absence de FOP a enregistré une moyenne de 2420 qui est classé dans le groupe homogène (b). La plus faible moyenne enregistrée par les interactions I5 en présence et en absence de FOP avec un l’indice de vigueur est de 1270 et 1210.63 respectivement.



Les valeurs suivies de la même de la lettre appartiennent au même groupe homogène, selon le test de Newman-keuls ($\alpha = 5\%$).

I2, I4, I5, I6, I8: isolats bactériens testés; TNB: témoin non-bacterisé

FOP: *Fusarium oxysporum* f. sp. *Pisi*; N FOP: Pas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Pisi*

Figure 17 : Effet du l’interaction du facteur bactérisation et le facteur suspension fongique sur l’indice de vigueur.

III.2. Discussion

L'objectif de cette recherche est de caractériser les micro-organismes responsables de cette maladie en utilisant divers tests biochimiques, à travers une analyse microbiologique d'échantillons collectés à partir de la zone racinaire des plantes de petit pois (*Pisum sativum* L). Dans cette optique, la coloration de Gram est une méthode qui permet de distinguer les bactéries Gram-positives des bactéries Gram-négatives en se basant sur la manière dont le violet de gentiane se fixe, mettant ainsi en évidence la forme et la teinte des colonies bactériennes. L'observation microscopique a révélé la présence de deux souches bactériennes : Bacille à Gram (-) Cocci à Gram (+). Selon le résultat de SALMI *et al.*, (2019) Le résultat montre que à partir de 49 souches isolées La plupart des souches sont des Cocci gram positif qui représente 28(57%) alors que 21(43%) représente des bacille Gram négatif. Où leurs résultats semblaient similaires à nous résultat, la plupart des souches sont des Cocci gram positif qui représente 5 souche alors que 4 souche représente des bacille Gram négatif. Nos résultats concordent avec ceux retrouvés dans des études récentes, à Bouguenoun., 2017, à l'ouest algérien, Oran (Dali., 2015), au Maroc (Quassimi., 2010) et en Inde (Sahu *et al.*, 2016)

De plus, un examen supplémentaire a été conduit, visant à évaluer la capacité de la souche bactérienne à fermenter le mannitol, dans le but de déterminer sa mobilité. Pour les résultats du test mannitol-mobilité pour les dix souches sont mannitol positif par contre on retrouve 9 souche immobile et une seule souche sont des souches mobiles. Des constatations similaires ont été rapportées dans des études antérieures, notamment par Gerhardt *et al.* (1994), qui ont observé que les bactéries mobiles se propagent à partir de la zone d'ensemencement, créant une turbidité dans le milieu, tandis que les bactéries immobiles se développent uniquement le long de la ligne d'ensemencement. Conformément à ces observations, notre étude a également produit des résultats positifs concernant le test de mobilité pour les souches que nous avons testées. Ces résultats sont en accord avec d'autres recherches antérieures, notamment celles de Dhayanithi *et al.* (2010), Zarei *et al.* (2010), et Catherine *et al.* (1999).

En l'occurrence, l'identification de ces souches est réalisée par le biais des tests biochimiques en utilisant un milieu dit *TSI (Triple Sugar Iron)* utilisé pour l'indication des bactéries Gram – par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène nos observations sont en accord avec les travaux de Berche *et al.* (1988), qui dans des tests réalisés sur la souche d'*Escherichia coli* ont constaté la fermentation du lactose, du saccharose et du glucose avec production de gaz et ont remarqué aussi un changement de couleur du marron vers le jaune ;

ces réactions confirment bien qu'il s'agit de bactéries Gram- ,Il est à signaler que pour la souche Gram+ aucun changement de couleur n'a été observé.

Par ailleurs, un autre test réalisé *dans* le milieu de citrate de *Simmons* qui un milieu synthétique où la seule source de carbone est le citrate a révélé un changement de couleur du vert vers le bleu le virement de couleur confirme que ces souches bactériennes sont des *Gram*. Ces constatations sont confirmées dans les travaux de plusieurs auteurs (Sylla, 2005 ; Ying *et al*, 2009 ; Nkang *et al*, 2009 ; Zarei *et al*, 2010).

De nombreux types d'enzymes bactériennes ont été étudiés en profondeur dans la littérature scientifique, notamment les cellulases, les amylases, les xylanases, les mannanases, les pectinases, les chitinases, les protéases, les lipases, les estérases, les phosphatases et les phytases. Elles sont à la fois spécifiques du type de réaction catalysée et d'un seul substrat ou d'un petit ensemble de substrat fortement apparentés (Granner *et al*, 2008), L'amylase est une enzyme hydrolysant l'amidon. Elle est constituée d'une α -amylase et d'une β -amylase (Pandey *et al*, 2000). Les huit souches (I1, I2, I3, I4, I5, I6, I7, I8) démontrent la capacité d'hydrolyser l'amidon, indiquant ainsi leur présence d'une amylase. Cette hydrolyse de l'amidon se manifeste par la formation d'une zone claire autour des colonies bactériennes. Khandeparker *et al*. (2011) ont été identifiés des isolats bactériens marins capable de produire des enzymes dégradant les carbohydrates (amylase, cellulase, hémicellulase). La majorité de ces bactéries appartiennent au genre *Bacillus* suivi de *Vibrio*, *Marinobacter*, *Exiquinobacterium*, *Alteromonas*, *Enterobacter* et *Aeromonas*.

Les résultats de l'analyse de l'AIA mettent en évidence une production exceptionnelle de cette hormone synthétisée. La production de ce composé est variable d'un isolat à l'autre. L'analyse de contraste révélé un effet significatif de la production d'AIA sur les souches I1, I2, I3, I4, I5, I6, I7, I8, I21, INSI. Selon Howell *et al*. (1988), l'ammoniac produit comme intermédiaire du catabolisme des acides aminés des exsudats racinaires assimilés par la bactérie est un agent inhibiteur des phytopathogènes. La production de NH_3 est très fréquente chez les souches isolées. Ce taux est comparable à ceux mentionnés par plusieurs travaux de Joseph *et al*. (2007) et Ahmed *et al*. (2008) Où leurs résultats semblaient similaires à mon résultat, Tous les isolats examinés présentent une production d'ammonium (NH_4^+) à l'exception de l'isolat (I1)et L'isolat I21 se démarque comme étant le plus efficace en termes de production d'ammoniac (NH_4^+), bien que cette production varie considérablement d'une souche à l'autre.

Les résultats obtenus ont montré que certaines rhizobactéries antagonistes n'ont pas la capacité de produire l'HCN. Et la production est plus importante pour la souche 1. Les travaux *in vitro* de Blumer et Haas (2000) confirment notre hypothèse où la croissance de plusieurs champignons phytopathogènes a été inhibée suite à la production de HCN via la phase gazeuse.

D'après nos résultats, nous avons observé que l'activité antagoniste de toutes les souches était plus prononcée envers les espèces *Fusarium graminearum* (FG) ; *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; (FOL); *Fusarium culmorum* (FC); *Fusarium oxysporum* f.sp. *Pisi* (FOP), lorsqu'elles étaient cultivées sur les deux milieux de culture KB et TSA. La souche I3 a enregistré le taux d'inhibition le plus élevé envers ces quatre espèces. Selon à l'étude de Benchabane *et al.* (2000), il a été noté que les taux d'inhibition étaient nettement moins élevés sur le milieu PDA par rapport à ceux observés sur les milieux King B. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les deux souches ne produisent pas suffisamment de pyoverdines (pigments fluorescents) dans le milieu PDA.

D'après les résultats de notre essai, nous avons constaté que la différence très hautement significative, Selon les résultats sur le taux de germination est variable Pour les isolats I5 et TNB en présence FOP et les isolats I8, I2 en son absence ont enregistré le meilleur taux de des moyennes qui varient entre 100 %. Globalement, pour les résultats de l'indice de vigueur nous avons constaté chez les traitements I2 et I8 en présence FOP sont supérieure au traitements non bactériés TNB

Nos isolats Appartenant aux PGPR (Plant-GrowthPromoting Rhizobacteria), elles possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Ainsi leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (Haas et Keel, 2003). L'adsorption des bactéries à la racine résulte d'interactions physico-chimiques et biologiques entre les bactéries et la racine (Lemanceau, 1992). Cette seule colonisation peut entraîner une occupation de sites suffisantes pour empêcher la croissance des pathogènes (Kamilova *et al.*, 2005). Il existe des régulateurs de la croissance végétale telle que les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'éthylène et l'acide abscissique. L'acide indole-3-acétique est la phytohormone la plus répandue. L'AIA joue un rôle très important dans l'élongation des racines et dans la prolifération des poils absorbants. Il est produit par un grand nombre des bactéries tels *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Rhizobium*, *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas veronii*, *Alcaligenes piechaudii*, *Rhizobium leguminosarum*, *Bradyrhizobium spp.*,

Agrobacterium spp., et *Comamonas acidovorans spp.* Les cytokinines et les gibbérellines sont impliquées dans la modification de la morphologie des plantes et dans la stimulation et le développement de la partie aérienne (Rabhi, 2012). Nos isolats sont des productrices de l'AIA ; les rhizobactéries produisant l'AIA sont connues pour leurs capacités à augmenter la croissance et la longueur des racines. Cet effet résulte en une surface racinaire plus grande, et une accessibilité pour plus de nutriments pour la plante. (Patten et Glick, 2002) et un indice de vigueur plus élevé, La rhizosphère est appropriée pour trouver des bactéries ayant des capacités à stimuler la croissance végétale (Sáenz-Mata *et al.*, 2016).

La compétition pour l'espace et les nutriments dans certains cas, les rhizobactéries à croissance rapide peuvent éliminer les pathogènes fongiques par une compétition pour le carbone et les sources d'énergie (Kamilova *et al.*, 2005). Les PGPR sont présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago, 2005). Les PGPR ont la capacité à dégrader les parois cellulaires fongiques à travers la production d'enzymes hydrolytiques tels β -1,3-gluconase, exo et endopolygalacturonases, pectinolyases, cellulases et chitinases (Rabhi, 2011). Ces enzymes hydrolytiques s'accumulent au site de pénétration de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* et par conséquent, elles peuvent être directement impliquées dans la dégradation des parois cellulaires fongiques (Benhamou *et al.*, 1996).

Conclusion

Conclusion

En conclusion, cette étude apporte une contribution significative à notre compréhension de la fusariose vasculaire du petit pois (*Pisum sativum*) et de son interaction avec les rhizobactéries. Les résultats obtenus ouvrent des perspectives prometteuses pour le développement de méthodes de lutte biologique durables contre cette maladie fongique dévastatrice.

Cette étude visait à sélectionner et évaluer les *Azotobacter* isolées à partir de la rhizosphère des plantes de la petit pois en fonction de leurs activités améliorant la croissance des plantes, y compris celles qui jouent un rôle dans la fertilisation biologique, comme la solubilisation du phosphate et la fixation de l'azote, ainsi que celles considérées comme des stimulants biologiques produisant principalement l'auxine, et enfin les bactéries ayant des activités de lutte biologique visant à protéger les plantes contre les maladies causées par les phytopathogènes, telles que la production de sidérophores et de composés volatils (HCN et NH₃).

_Dans une étude sur la base des résultats obtenus dans les tests biochimique et physiologique, nous pouvons conclure, les résultats obtenus pour l'analyse biochimique montrent que la plupart de ces bactéries utilisaient le mannitol comme source de carbone et d'énergie. Un groupe d'entre eux utilise des substrats carbonés comme source de carbone, avec trois sucres dont le glucose, le lactose et le saccharose utilisés; mais cette variation d'assimilation varie d'une bactérie à l'autre et d'un sucre à l'autre.

_Les résultats des tests d'activités enzymatiques à savoir : la synthèse des lipases, Amylases, ainsi que la phosphatase, ont permis de montrer des résultats potentiels. Les souches se sont montrées positives pour ces 03 activités. Nous en concluons que les bactéries rhizosphériques étudiées dans ce travail sont capables de produire diverses enzymes d'importance agricole.

Les résultats constatés expérimentaux sur l'essai de biocontrôle de *Fusarium oxysporum f.sp. pisi in vivo* et sur la germination des graines, nous avons remarqué que les souches bactériennes testées n'ont pas d'effet significatif sur la stimulation de la germination des graines.

Conclusion

En perspectives, il est possible d'identifier de nouvelles souches bactériennes dotées de caractéristiques uniques pour améliorer la santé des plantes, et cette approche peut être élargie pour couvrir d'autres types d'agents pathogènes et de flore. De plus, l'isolement et l'identification des souches bactériennes jouent un rôle crucial dans le développement de solutions de lutte biologique plus efficaces et durables.

Il est possible d'explorer l'effet des rhizobactéries sur la promotion de la croissance des plantes, ainsi que de mener des tests de confrontation antifongique entre différentes souches bactériennes isolées et d'autres espèces.

Il est envisageable d'explorer l'étude des rhizobactéries en tant que facteur de promotion de la croissance des plantes, ainsi que de réaliser des tests de confrontation antifongique entre d'autres espèces et les souches bactériennes isolées.

Référence

A

- Agrios G.N. (1988).** “*Plant Pathology*”, 3rd. Ed. Academic Press, Inc.: New York, 803p.
- Bani M. Rubiales D. And Rispail 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.
- Agrios G.N. 2005.** *Plant Pathology*. Fifth Edition, Elsevier Academic Press, California 92101, 524-539.
- Agrios, G.N., 2005.** *Plant Pathology*. 5th Ed, Elsevier Academic Press, California 92101, 524-539.
- Ahmad, F., I. Ahmad Et M.S. Khan (2008).** Screening Of Free-Living Rhizospheric Bacteria For Their Multiple Plant Growth Promoting Activities. *Microbial Research*, 163: 173-81.

B

- 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, (2015), 187p.
- Bearcia Aya Et Al, 2021.** Isolement A Partir De La Rhizosphère Des Céréales Des Bactéries Bénéfiques Et Antagonistes Aux Microorganismes Phytopathogènes.
- Beckman C.H. Et Roberts E.M., 1995.** On The Nature And Genetic Basis For Resistance And Tolerance Of Fungal Wilt Diseases. *Advances In Botanical Research*, 21: 35-77.
- Benchabane M., Bakour R., Toua D., Boutekrabi A. (2000)** Mise En Evidence De L'effet Antagoniste De *Pseudomonas Fluorescens* vis-A-vis De La Fusariose Vasculaire De La Tomate. *EPPO Bulletin*, 30: 243–246
- Berche P., Gaillard J.L., Simonet M. (1988).** Bactéries Des Infections Humaines.
- Bishop C.D. Et Cooper R.M., 1983a.** An Ultrastructural Study Of Root Invasion Of Three Vascular Wilt Diseases. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 22 : 15-27.
- Blumer, C., And D. Haas. 2000.** Mechanism, Regulation, And Ecological Role Of Bacterial Cyanide Biosynthesis. *Arch Microbiol* 173:170-177.

Bouguenoun W. 2017. Étude De La Résistance Aux Antibiotiques Des Incriminées Dans Les Infections Nosocomiales Et Leur Dissémination Dans L'environnement Hospitalier De La Région De Guelma. Thèse De Doctorat D'état, Université Badji Mokhtar-Annaba, 176 P

Bounaga , R., 1985, "Contribution A L'etude De Fusarium Oxysporum F.Sp. Albedenis (Killian Et Maire) Gordon, Agent De La Fusariose De Palmier Dattier ", Thèse Doc, U.S.T.H.B. Alger, 180p.

Burgess L. W. Et Liddell C. M., 1983. *Laboratory Manual For Fusarium Research.* University Of Sydney, 162p.

C

Campbell R, Greaves MP. (1990). Anatomy And Community Structure Of The Rhizosphere In The Rhizosphere (Ed. J.M.Lunch), John Wiley & Sons, Ltd, Essex. Pp:11-34.

Catherine, A.M., Robert, B. (1999). Genomic Rearrangements In The Flagellin Genes Of *Proteus Mirabilis*. *Molecular Microbiology.* 31 (2) : 679–690.

Corbaz,R., 1990, " Phytopathologie Et De Lutte Contre Les Maladies Des Plantes", Presses , Polytechniques Et Universitaires Romandes,266p.

Coussin R.,1974. Le Pois : Annales De L'amélioration Des Plantes.INRA,Paris. 10-117.

D

Dali, A.A. (2015).Thèse De Doctorat : Infections Nosocomiales A Bactéries Multirésistantes (BMR) En Réanimation Adules A L'ehuo: Profile Epidémiologique, Facteurs De Risque Et Facteurs Pronostiques. Université d'Oran 1 Ahmed BENBELLA, Oran, Algérie.

Day DA, Poole PS, Tyerman SD, Rosendahl L. 2001. Ammonia And Amino Acid Transport Across Symbiotic Membranes In Nitrogen-Fixing Legume Nodules. *Cellular And Molecular Life Sciences.* 58: 61–71. ;

- Defago, G., Et Haas, D., 1990,** " *Pseudomonas* As Antagonists Of Soilborne Plant Pathogens: Modes Of Action And Genetic Analysis", In: Soil Biochem, 6.J.M. Bollag Et G. Stotzky,Eds. Marcel Dekker, New York,249-291.
- Dey R., Pal K.K., Bhatt D.M. Et Chauhan S.M., 2004.** Growth Promotion And Yield Enhancement Of Peanut (*Arachis Hypogaea* L.) By Application Of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Microbio.Res.*, 159 : 371-394.
- Dhayanithi, N.B., Ajith Kumar, T.T., Kathiresan, K. (2010).** Effect Of Neem Extract Against The Bacteria Isolated From Marine Fish. *Journal Of Environmental Biology.* 31 : 409-412.
- Di Pietro A., Madrid M.P., Caracuel Z., Delgado-Jarana J., Roncero M.I.G., 2003.** *Fusarium Oxysporum*: Exploring The Molecular Arsenal Of A Vascular Wilt Fungus. *Molecular Plant Pathology*, 4 : 315-325.
- Dobbelaere S., Vanderleyden J., Okon Y., 2003.** Plant Growth Promoting Effects Of Diazotrophs In The Rhizosphere. *Plant Sci.*, 22 : 107-149.
- Downie JA. 2005.** Legume Haemoglobins: Symbiotic Nitrogen Fixation Needs Bloody Nodules. *Current Biology.* 15: 6.
- Dreyfus B, Dommergues Y. 1981.** Nitrogen-Fixing Nodules Induced By *Rhizobium* On The Stem Of The Tropical Legume *Sesbania Rostrata*. *FEMS Microbiology Letters.* 10: 313–317.

F

- FAOSTAT 2011.** FAOSTAT-Agriculture., “Food And Agricultural Commodities Production. Food And Agriculture Organization”, Rome.
- Fischer S. E., Jofre E. C., Cordero P. V., Gutierrezmanero F. J., Mori G. B., 2009.** Survival Of Native *Pseudomonas* In Soil And Wheat Rhizosphere And Antagonist Activity Against Plant Pathogenic Fungi. Facultad De Farmacia, Universidad San Pablo CEU, Boadilladel Monte, Madrid, Espana
- Fisher HM. 1994.** Genetic Regulation Of Nitrogen Fixation In Rhizobia. *Microbiology Reviews.*58: 352–386.
Flammarion Médecine-Sciences. P. 100-545.
- Fravel D., Olivain C., Alabouvette C., 2003.** *Fusarium Oxysporum* Its Biocontrol. New

G

- Gage D.J., 2004.** Infection And Invasion Of Roots By Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobium During Nodulation Of Temperate Legumes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68 : 280-300.
- Gams W. Et Nirenberg H.I., 1989.** A Contribution To The Genetic Definition *Fusarium*. *Mycotaxon*, 35 : 407-416.
- Gazou S., 2016.** Les Effets Bénéfiques De *Pseudomonas* Spp. Fluorescents Dans La Biostimulation Et Biocontrôle Des Végétaux P 76.
- Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC. 2008.** Molecular Determinants Of A Symbiotic Chronic Infection. *Annual Review Of Genetics.* 42: 413–441.
- Giraud E, Fleischman D. 2004.** Nitrogen-Fixing Symbiosis Between Photosynthetic Bacteria And Legumes. *Photosynthesis Research.* 82: 115–130.
- Glick B.R., Penrose D. Et Li J., 1998.** A Model For The Lowering Of Plant Ethylene Concentrations By Plant Growth-Promoting Bacteria. *Journal Of Theoretical Biology*, 190 : 63-68.
- Glick B.R., Todorovic .B, Czarny.J, Cheng.Z, Duan.J, Mcconkey.M, 2007.** Promotion Of Plant Growth By Bacterial ACC Deaminase. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 26 (5), 227–242.
- Glick BR. (1995).** The Enhancement Of Plant Growth By Free-Living Bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.
- Gray E.J. Et Smith D.L., 2005.** Intracellular And Extracellular PGPR : Commonalities And Distinctions In The Plant–Bacterium Signaling Processes. *Soil Biol Biochem*, 37 : 395-412.
- 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.

H

- Haas D., Et Defago G., 2005.** Biological Control Of Soil-Borne Pathogens By Fluorescent Pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 4 : 307-319.
- Halila, M. H., Strange, R. N., & Phan, H. T. T. (2000).** Sources Of Resistance To *Fusarium Oxysporum* F. Sp. Pisi In *Pisum* Spp. And Improved Methods Of Evaluation. *European Journal Of Plant Pathology*, 106(9), 821-828.

Herman M.A.B., Nault B.A., Smart C.D., 2008. Effects Of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria On Bell Pepper Production And Green Peach Aphid Infestations In New York. *Crop. Protect.*, 27 : 996-1002.

Howell, C. R., R. C. Beier Et R. D. Stipanovic (1988). Production Of Ammonia By *Enterobacter Cloacae* And Its Possible Role In The Biological Control Of *Pythium* Preemergence Darnping-Off By The Bacterium. *Phytopathologia*, 78:1075- 1078.

J

Joseph, B., RR. Patra Et R. Lawrence (2007). Characterization Of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Associated With Chickpea (*Cicer Arietinum* L.). *Int. J. Plant Prod.*, 2: 141-152.

K

Kaminski PA, Boistard P. 1998. A Survely Of Symbiotic Nitrogen Fixationby Rhizobia. In The *Rhizobiaceae*, Pp. 431–460. In Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ (Eds). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic.

Khan M.S., Zaidi .A. 2005. Interactive Effect Of Rhizospheric Microorganisms On Growth, Yield And Nutrient Uptake Of Wheat. *J Plant Nutrition*, 28:2079–2092.

Kloepper, J W. (1992). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria As Biological Control Agents. In: FB Metting Jr, Ed, *Soil Microbial Ecology: Applications In Agricultural And Environmental Management*. *Marcel Dekker Inc.*, New York, Pp 255-274.

Kloepper, J W., R. Litshitz Et R. M. Zablotowicz (1989). Free Living Bacterial Inocula For Enhancing Crop Productivity. *Trends Biotechnol.* 7: 39-43.

Kloepper, J. W. (1993). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria As Biological Control Agents, In: *Soil Microbial Ecology*, (Ed.) F. B. Jr., Metting. *Marcel Dekker Inc.*, N. Y. P.255-273.

Kraft J.M. Et Pflieger F.L., 2001. *Compendium Of Pea Diseases*, 2nd Ed., APS Press, St. Paul, MN, USA.

Kraft J.M., 1994. *Fusarium* Wilt Of Pea (A Review). *Agronomie*14 : 561-567.

Kraft J.M., Larsen R.C., Inglis D.A., 1998. Diseases Of Pea. In: Allen, D.J., Lenné, J.M., *The Pathology Of Food And Pasture Legumes*. CAB International, Wallingford, UK. : 325-370.

Kraft J.M., Pflieger F.L., 2001. *Compendium Of Pea Diseases*, APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 67p.

Kraft, JM. And Pflieger, F.L.,2001, “Compendium Of Pea Diseases And Pests”, 2nd ED., The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, (2001), 67.

Kroes J.G., Van Dam J.C., Huygen J.Et Vervoort R.W., 1998. *User's Guide Of SWAP Version 2.0. Simulation Of Water Flow, Solute Transport And Plant Growth In The Soil-Water-Atmosphere-Plant Environment*. Agricultural University, Wageningen. PUDOC, Wageningen, Simulation Monographs. 189p.

L

Lodwig E, Poole P. 2003. Metabolism Of *Rhizobium* Bacteroids. *CRC Crit Rev Plant Sci*. 22: 37–78.

Lucas J.A., 1998. *Plant Pathology And Plant Pathogens* 3rd Ed. Blackwell Science. 274p.

Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review Of Microbiology*, 63, 541-556.

M

Mac Hardy W.E. Et Beckman C.H., 1981. Vascular Wilt Fusaria: Infections And Pathogenesis. In Nelson P.E., Toussoun T.A., Et Cook R.J., *Fusarium : Diseases, Biology And Taxonomy*. The Pennsylvania State University Press, University Park And London. : 365-390.

Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J. 2009. Establishing Nitrogen-Fixing Symbiosis With Legumes: How Many *Rhizobium* Recipes? *Trends Microbiol* 17: 458–466.

Mateos P.F., Baker D.L., Petersen M., Velázquez E., Jiménez-Zurdo J.I., Martínez-Molina E., Squartini A., Orgambide G., Hubbell D.H. Et Dazzo F.B., 2001. Erosion Of Root Epidermal Cell Walls By *Rhizobium* Polysaccharide-Degrading Enzymes As Related

To Primary Host Infection In The *Rhizobium*-Legumesymbiosis. *Can J Microbiol.*, 47 : 475-487.

Mendgen K., Hahn M. Et Deising H., 1996. Morphogenesis And Mechanisms Of Penetration By Plant Pathogenic Fungi. *Annual Review Of Phytopathology*, 34 : 367- 386.

Merzoug A., Belabid L., Youcef-Benkada M., Benfreha F., Bayaa B.2014. Pea Fusarium Wilt Races In Western Algeria. *Plant Protect Sci.*, 50:70–77.

Meudec G., Prat J.Y., Retournard D., 1998. Soignez Toutes Les Plantes Potagères : Espèce Par Espèce, Éd. Rustica, 304 P.

Mezaache Samia .2012. Localisation Des Déterminants De La Suppression De Quelques Souches De Pseudomonas Isolées De La Rhizosphère De La Pomme De Terre. Thèse Doctorat, Université Ferhat ABBAS Sétif Faculté Des Sciences De Nature Et De La Vie .

Michelle I., 2006. *Diversity Of Root Nodule Bacteria Associated With Phaseolus Coccineus And Phaseolu Svulgaris Species In South Africa.* University Of Protoria.

Michielse, CB. Rep, M. 2009. Pathogen Profile Update: Fusarium Oxysporum. *Molecular Plant Pathology*, 10 (3): 311-324.

Michielse, CB. Rep, M. 2009. Pathogen Profile Update: Fusarium Oxysporum. *Molecular Plant Pathology*, 10 (3): 311-324.

Minorsky P.V., 2008. On The Inside. *Plant. Physiol.*, 146 : 323-324.

Mulder L., Hogg B., Bersoult A., Cullimore J.V., 2005. Integration Of Signaling Pathways In The Establishment Of The Legume-Rhizobia Symbiosis. *Physiol. Plant.*, 123 : 207-218.

N

Nelson P.E., 1981. Life Cycle And Epidemiology Of *Fusarium Oxysporum* . In : Mace M.E, Bell A.A, Et Beckman C.H., *Fungal Wilt Diseases Of Plants.* Academic Press. New York. 3 : 51-80.

Newton WE. 2007. Physiology, Biochemistry And Molecular Biology Of Nitrogen Fixation. In:Ferguson BH, SJ NWE (Eds) *Biology Of Nitrogen Cycle.* Elsevier, Amsterdam, P 109–130.

Nkang A.O., Okonko O.I., Fowotade A., Udeze A.O., Ogunnusi T.A., Fajobi E.A., Et Al.(2009). Antibiotics Susceptibility Profiles Of Bacteria From Clinical Samples In Calabar, Nigeria. *J. Bacteriol. Res.* 1 (8) : 89-96.

O

- Oldroyd G.E., Murray J.D., Poole P.S., Downie J.A., 2011.** The Rules Of Engagement In The Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annual Review Of Genetics*, 45 : 119-144.
- Olivain C. Et Alabouvette C., 1999.** Process Of Tomato Root Colonization By A Pathogenic Strain Of *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *Lycopersici* In Comparison With A Non-Pathogenic Strain. *New Phytol.*, 141 : 497-510.
- Ongena M., Jacques P., Delfosse P. Et Thonart P., 2002.** Unusual Traits Of The Pyoverdine Mediated Iron Acquisition System In *Pseudomonas Putida* Strain BTP1. *Biometals.*, 15, 1 :1-13
- Ott, T., Van Dongen, J.T., Gunther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., And Udvardi, M.K. 2005.** Symbiotic Leghemoglobins Are Crucial For Nitrogen Fixation In Legume Root Nodules But Not For General Plant Growth And Development. *Curr Biol* 15, 531-535.
- Ouellet H., Ouellet Y., Richard C., Labarre M., Wittenberg B., Wittenberg J., Guertin M., 2002.** Truncated Hemoglobin Hbn Protects Mycobacterium Bovis From Nitric Oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 30, 9 : 5902-7.

P

- Pant, R. Et A. N. Mukhopadhyay. 2001.** Integrated Management Of Seed And Seedling Rot Complex Of Soybean. *Indian Phytopathology* 54:345-350.
- Paul, E. A., Et F. E. Clark (1996).** *Soil Microbiology And Biochemistry*, 2nd Edition. Academic Press, New York.
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. 2000.** Molecular Basis Of Symbiotic Promiscuity. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*. 64: 180–201.
- Perret X., Staehelin C. Et Broughton W.J., 2000.** Molecular Basis Of Symbiotic Promiscuity. *Microbiol Mol Biolrev.*? 64: 180-201. *Phytologist*, 157: 493–502.

Q

Qassimi, L. (2010) Thèse De Doctorat : Épidémiologie Des Infections Nosocomiales En Milieu De Réanimation (A Propos De 147 Cas). Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. Fes, Maroc.

R

Ramos-Solano B., Barriuso-Maicas J., Gutierrez-Mañero J., 2009. Biotechnology Of The Rhizosphere. In: Kirakosyan A. Et Kaufman P.B., *Recent Advances In Plant Biotechnology*. Springer Science & Business Media. 137-162.

Recorbet G. Et Alabouvette C., 1997. Adhesion Of *Fusarium Oxysporum* Conidia To Tomato Roots. *Letters In Applied Microbiology*, 25 : 375-379.

Rodriguez-Navarro D.N., Dardanelli M.S. Et Ruiz-Sainz J.E., 2007. Attachment Of Bacteria To The Roots Of Higher Plants. *FEMS Microbiol Lett.* 272 : 127-136.

S

Safa SALMI Et Meryem SAYAH (2019) Etude De La Contamination Bactérienne De L'environnement Hospitalier (Hôpital De Sidi Okba -Biskra-). P 27

Sahu, M.K., Siddharth, B., Choudhury, A., Vishnubhatla, S., Singh, S.P., Menon, R., Gerhardt, P., Murray, R. G. E. (1994). Wood W.A. And Krieg N.R. Methods For General And Molecular Bacteriology. Washington DC, ASM, USA.

Sakthivel, N., Et Gnanamanickam, S.S., 1989, "Incidence Of Different Biovars Of *Pseudomonas Fluorescens* In Flooded Rice Rhizospheres Of India", *Agriculture, Ecosystem And Environment* 25,287-295.

Sana Dhane Fitouri. 2011. Diversités Phénotypique Et Moléculaire Des Microsymbiotes Du Sulla Du Nord (*Hédysarum Coronarium* L.) Et Sélection De Souches Rhizobiales Efficientes Institut National Agronomique De Tunisie -Doctorat En Sciences Agronomiques.

Savka M.A., Dessaux Y., Oger P. Et Rossbach S., 2002. Engineering Bacterial Competitiveness And Persistence In The Phytosphere. *Mol Plant Microbe Interact.*, 15 : 866-874.

Schippers B. Et Van Eck W.H., 1981. Formation And Survival Of Chlamydo spores In *Fusarium*. In : Nelson P.E., Toussoun T.A., Cook R.J., *Fusarium : Diseases, Biology And Taxonomy*. The Pennsylvania State University Press, University Park And London. 250-260

Sibylla Rometsch, Février, 2009. Pisum Sativum subsp. Biflorum Etude De Cas Pour Une Espèce Sauvage Menacée Apparentée A Une Espèce Cultivée, P8

Smýkal Petr , Clarice Coyne, Robert Redden And Nigel Maxted, 2013, "Peas", Genetic And Genomic Resources Of Grain Legume Improvement, United States Department Of Agriculture, Agricultural Research Service P41

Stover R.H., 1962. *Fusarial Wilt (Panama Disease) Of Bananas And Other Musa Species*. Commonwealth Mycological Institute. Surrey, UK, 177 Pp.

Sylla M.B. (2005). Infections Invasives A *Escherichia Coli* Dans Le Service De Pédiatrie Du CHU Gabriel Touré Bamako. Thèse De Doctorat. Université De Bamako. 58 P.

V

Vidhyasekaran P., 1997. *Fungal Pathogenesis In Plants And Crops. Molecular Biology And Host Defense Mechanisms*. Marcel Dekker Inc. New York. 553p.

W

Wang D., Yang S., Tang F., Zhu H., 2012. Symbiosis Specificity In The Legume : Rhizobial Mutualism. *Cellular Microbiology*, 14 : 334-342.

Y

Ying T.C., Tsai L.L., Keh-Ming W., Jing-Jou Y., I.Wen H., Min-Chi L., Et Al. (2009). Genomic Diversity Of Citrate Fermentation In *Klebsiella Pneumoniae*. *BMC Microbiology*. 168 : 1-9.

Zahir, Z A, M. Arshad Et WT. Frankenberger (2004). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Applications And Perspectives In Agriculture. *Adv. Agron.*, 81, 97-168.

Zarei M., Aminzadeh S., Zolgharnein H., Safahieh A., Ghoroghi A., Daliri M., Et (2010). *Serratia Marcescens* B4A Chitinase Product Optimization Using Taguchi Approach. *Journal Of Biotechnology*. 8 (4) : 252-262.

Zarei, M., Aminzadeh, S., Zolgharnein, H., Safahieh, A., Ghoroghi, A., Daliri, M., Et Al.(2010). *Serratia Marcescens* B4A Chitinase Product Optimization Using Taguchi Approach. *Journal Of Biotechnology*. 8 (4) : 252-262.