



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



Faculté des Sciences et de la Technologie  
Département des Sciences de la Nature et de la Vie  
Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme  
De Master académique en  
**Filière** : Sciences Biologiques  
**Spécialité** : Microbiologie appliquée

**Présentée par :**

HADJI Khalida  
DAMOU Sabah  
ARIB Nour El Hoda

**Thème**

---

***PSEUDOMONAS* : UNE RESSOURCE MICROBIENNE PERMET  
DE VALORISER LE POTENTIEL SYMBIOTIQUE**

---

Soutenu le,14/Juin/2023

**Devant le Jury :**

BEKADA A	Président	Prof.	Univ-Tissemsilt
LAABAS S	Encadrant	M.C.A	Univ-Tissemsilt
DRIS I	Examineur	M.C.B	Univ-Tissemsilt

**Année universitaire : 2022/2023**

## **Remerciements**

*Au terme de ce travail, nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH le tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné le courage et la volonté durant toutes ces années d'étude, afin que nous puissions achever ce travail, et nous profitons l'occasion pour remercier du fond du cœur toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à M<sup>elle</sup> LAABAS Saadia professeur encadrant pour sa confiance et sa disponibilité de tous les instants, sa gentillesse et ces conseils précieux qu'il nous a prodigués tout au long de la réalisation de ce travail.*

*Nous remercions également à tous les membres du jury, pour avoir accepté d'en faire partie et pour l'intérêt qu'elles ont porté à ce mémoire M BEKADA, d'avoir accepté de présider le Jury. , M DRIS d'avoir examiné ce travail.*

*Nous remercions M SI EL ARBI et M DRIS Ibrahim pour leurs efforts et leur aide.*

*Nous adressons nos remerciements le groupe du laboratoire d'université de Tissemsilt surtout Mms CHAHIH Hadjira et M AFER Mehamed pour leur accueil et la confiance qu'ils nous ont accordé au cours de la réalisation de ce travail*

*Nous adressons nos remerciements à toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.*

## *DEDICACE*

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

*A ma mère **Bakhta**, pour son amour, ses encouragements et ses  
sacrifiées*

*Amon père **Mehamed**, pour son soutien, son affection et la confiance  
qu'il m'a accordé*

*Je sais bien quelque soit les remerciements que je leurs adresse c'est  
peu, que Dieu les protège Et leur donne la santé et une longue vie.*

*A mes chères Frères : **Lakhdar, Tayeb, Fouad***

*Mes très chères sœurs : **Amína, Hakíma***

*Pour ses soutiens moral et leurs conseils précieux tout au long de mes  
études*

*A mes chers binômes*

*A mes chères amies : **Abír, Ahlam, Soumía, Zakía, Walaa, Samía,  
Ranía, Manal***

*Pour leurs aides et supports dans les moments difficiles*

*A tous les membres de ma famille et toute personne qui porte le nom  
**HADJI...***

*Khalida*

## **DEDICACE**

*Dieu louez Tout-Puissant, qui m'a permis de voir ce jour tant attendu.*

*Avec une profonde gratitude et des mots sincères, je*

*Dédie cette humble lettre ;*

*À l'âme de mon très cher père **Mohamed (chomay)**, Je dédie ma graduation à celui dont je porte le nom avec fierté, que a voulais être avec moi.*

*Aujourd'hui, Si je te remercie pour toujours, je ne*

*Remplirai pas ton droit de remerciement je t'aime mon*

*Héros. Que dieu vous accueille dans son vaste paradis*

*À ma très chère mère **-Bakhta-***

*Mon soutien, ma force moral et m'a source de joie et du*

*Bonheur, que Dieu te garde et te protège pour moi.*

*À ma chère grand-mère **Kalthoum**, que dieu te donne une longue vie pleine de joie et de santé.*

*À mes chers Frères : **Mohamed, Haythem** ainsi que mes sœurs : **Ahlem, Nada Al-Rayhan***

*A tous ceux qui appartiennent à la famille **Damou** et **Nemri***

*À mes chers amis (es) et mes chers collègues*

*Merci pour tous les moments inoubliables.*

***Sabah***

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail*

*ALLAH le tout puissant à qui je dois tout*

*A Mes très chers parents*

*· Mon père "Ali", qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie .Merci pour les valeurs nobles, la confiance et le soutien permanent venu de toi.*

*À ma chère maman" Khayra "qui n'a jamais cessé de prier pour moi, Source de mon bonheur qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.*

*A mes chers frères Mohammed, Yousef et Karim, que je les aime énormément, Puise dieu vous donne la santé, le courage et la réussite .*

*Je n'oublie pas ma sœur Khaldia pour son soutien et ses encouragements .*

*A mes amis et collègues : Pour leur compagnie et bons moments passés ensemble un grand merci*

*A ma chère tante et ses filles .Fatima et Laya, Merci beaucoup de m'avoir aidé et soutenu toutes ces années.*

*A tous les membres de ma famille et à tous ceux qui portent le nom de famille "ARIB"*

*Nour El Hoda*

## Liste des Abréviations

**PGPR:** Plant Growth Promoting Rhizobacteria  
**PGPre:** Les bactéries extracellulaires  
**PGPri:** Les bactéries intracellulaires  
**ACC :** Aminocyclopropane-1-carboxylate  
**IAA :** Acide indole-3-acétique  
**AIA :** Acide indole-3 acétique  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :** Peroxyde d'hydrogène  
**HCN :** Cyanure d'hydrogène  
**DAPG :** 2,4-diacétylphloroglucinol  
**COV :** Composé volatiles  
**ISR :** Résistance Systémique Induite  
**SAR :** Résistance Systémique Acquise  
**FAO:** Food and Agriculture Organization  
**P :** Phosphore  
**N<sub>2</sub> :** Azote Atmosphérique  
**NH<sub>3</sub> :** Ammoniac  
**O<sub>2</sub> :** Oxygène  
**UFC :** Unité Formant Colonie  
**JC :** Jésus-Christ  
**GN :** Gélose Nutritive  
**CaCl<sub>2</sub> :** Chlorure de calcium  
**PH :** Potentiel Hydrogène  
**USDA:** United States Department of Agriculture  
**Kda:** kilodalton  
**Hg:** Hectogram  
**RFCP :** Rhizobactérie favorise la croissance des plantes  
**H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> :** Acide phosphorique  
**HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> :** Phosphate d'hydrogène  
**Fe<sup>3+</sup> :** Ions Fer(III)  
**µm :** Micromètre  
**NO<sub>3</sub><sup>-</sup> :** Nitrate  
**UV:** Ultra violet

## TABLE DES MATIÈRES

Introduction .....	01
--------------------	----

### CHAPITRE I : Etude bibliographique

1. Généralité sur les légumineuses .....	02
1.1. Le petit pois ( <i>Pisum sativum L.</i> ).....	02
1.1.1. Généralité sur le petit pois ( <i>Pisum sativum L.</i> ).....	02
1.1.2. Origine et répartition géographique.....	02
1.1.3. La classification botanique.....	03
1.1.4. Les caractéristique botanique .....	03
1.1.5. La production de petit pois .....	04
1.1.5.1. La production mondiale .....	04
1.1.5.2. La production en Algérie.....	05
1.1.6. Le cycle de développement .....	06
1.1.6.1. Période végétative.....	06
a. Germination.....	06
b. Stade végétatif.....	06
1.1.6.2. Période reproductrice .....	06
a. Floraison.....	06
b. Formation des gousses et grain .....	07
2. les PGPR« Plant Growth Promoting Rhizobacteria» .....	07
2.1. Effet des PGPR.....	08
2.1.1. Effet direct des PGPR .....	08
2.1.1.1. Solubilisation de phosphore .....	08
2.1.1.2. La production des siderophore .....	08
2.1.1.3. La production des phytohormones.....	09
a. Les cytokinines .....	10
b. Les gibbérellines.....	10
c. Acide Indole Acétique .....	10
2.1.2. Effet indirect des PGPR .....	11
2.1.2.1. Production des antibiotiques.....	11
2.1.2.2. Production au cyanure d'hydrogène HCN .....	12
2.1.2.3. Composé volatiles.....	12
2.1.2.4. La Résistance systématique.....	12
3. <i>Pseudomonas sp.</i> .....	13
3.1. Taxonomie de <i>Pseudomonas sp.</i> .....	14
4. La symbiose rhizobium-légumineuses .....	14
4.1. La fixation biologique de l'azote .....	15
4.1.1. Les étapes de la nodulation .....	16

## CHAPITRE II : Matériel et méthodes

1. Isolats bactériens ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	17
1.1. Purification des souches	17
1.1.1. Examen macroscopique	17
1.1.2. Examen microscopique	18
1.2. Etude des enzymes respiratoires	18
1.2.1. Test catalase	18
1.2.2. Test oxydase	19
1.3. Galerie API 20 NE	19
1.4. Antibiogramme	20
1.5. Conservation des souches	20
2. Culture et inoculation des plantules "in vitro "	21
2.1. Echantillonnage de sol	21
2.2. Germination des graines	22
2.3. Inoculation des souches (cas de <i>Pseudomonas</i> )	22
2.4. Etude statistique	23

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

1. Isolats bactériens ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	24
1.1. Examen macroscopique	24
1.2. Caractéristiques microscopiques des isolats	25
1.3. Etude des enzymes respiratoires	25
1.3.1. Test catalase	25
1.3.2. Test oxydase	26
2. Identification des isolats par galerie API 20NE	26
3. Antibiogramme	27
4. Analyse physico-chimique de sol	28
5. Effet de l'inoculation de <i>Pseudomonas</i> sur le petit pois ( <i>Pisum sativum</i> L.)	29
5.1. Estimation de pouvoir symbiotique	30
5.2. Effet de l'inoculation sur le poids frais et sec des plantes	30
5.3. Effet sur la longueur de partie aérienne et racinaire	31
<b>Conclusion</b>	<b>33</b>

## Références bibliographiques

## Annexes

## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> La Plante de petit pois ( <i>Pisum sativum</i> L).....	04
<b>Figure 02 :</b> La production de petit pois dans certains pays européens .....	05
<b>Figure 03:</b> La Production de petit pois en Algérie en (2019) .....	05
<b>Figure 04 :</b> Le cycle de développement de petit pois ( <i>Pisum sativum</i> L).....	07
<b>Figure 05:</b> Fonction biologique des siderophore .....	09
<b>Figure 06:</b> L'importance de l'AIA dans l'amélioration de la croissance végétale .....	11
<b>Figure 07:</b> Micrographie électronique à transmission en fausses couleurs de bactéries aérobies du sol <i>Pseudomonas fluorescent</i> .....	14
<b>Figure 08:</b> Les étapes de la nodulation.....	16
<b>Figure 09 :</b> Purification de souche des isolats .....	17
<b>Figure 10:</b> Les étapes de coloration de gram.....	18
<b>Figure 11:</b> Inoculation de la galerie API 20 NE .....	19
<b>Figure 12:</b> Antibiogramme réalisé sur les souches testées .....	20
<b>Figure 13:</b> La conservation des souches sur gélose inclinée .....	21
<b>Figure 14:</b> Les graines de petit pois ( <i>Pisum sativum</i> L.) utilisées dans l'essai.....	21
<b>Figure 15 :</b> Les graines de petit pois avant et après la germination dans l'eau gélosée .....	22
<b>Figure 16:</b> Test d'inoculation des plantes de petit pois ( <i>Pisum sativum</i> L.) sous des conditions semi contrôlées .....	23
<b>Figure 17:</b> Aspect macroscopique des isolats après 24 h d'incubation à 30°C .....	24
<b>Figure 18:</b> Aspect microscopique des isolats après une coloration de gram (Grossissement x 1000) .....	25
<b>Figure 19:</b> Test de catalase positive .....	25
<b>Figure 20:</b> Test d'oxydase positive .....	26
<b>Figure 21:</b> Galerie API20NEensemencée par la souche B2 après 24 h d'incubation .....	26
<b>Figure 22 :</b> Résultat d'antibiogramme .....	28
<b>Figure 23 :</b> Test d'inoculation des plantes de petit pois ( <i>Pisum sativum</i> L.) par les souches testées .....	29
<b>Figure 24 :</b> Effet des souches sur le poids frais et secs de petit pois ( <i>Pisum sativum</i> L.) .....	31
<b>Figure 25 :</b> Effet des souches sur la partie aérienne et racinaire de petit pois ( <i>Pisum sativum</i> L.).	32

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Caractéristiques morphologiques des colonies après 24 h d'incubation à 30°C .....	24
<b>Tableau02</b> : Caractères des souches identifiées .....	27
<b>Tableau 03</b> : Résistance de souches aux antibiotiques .....	28
<b>Tableau 04</b> : Résultats d'analyses d'échantillon du sol (Tissemsilt) .....	29

# **INTRODUCTION**

Les légumineuses occupent une place particulière dans les systèmes culturaux, et sont considérées comme une source très importante de protéines pour la consommation humaine et animale (Mylona *et al.*, 1995) en particulier pour les populations à faible revenu (Pachico, 2005). Le petit pois (*Pisum sativum* L.) est parmi les légumineuses les plus répandues et les plus appréciées ; c'est un aliment de base, et sa consommation est liée à sa vertu diététique.

Dans les dernières années, la majeure partie de la production agricole dépend de l'utilisation de produits chimiques pour maintenir des productivités élevées afin de répondre aux besoins alimentaires de la population (Margni *et al.*, 2002), cette utilisation a provoqué des effets néfastes directs et indirects sur l'environnement et sur l'homme (Katrijn *et al.*, 2007).

En vue de protéger la production des cultures et en même temps d'améliorer leur rendement de manière saine et biologique, il convient de penser à une alternative efficace permettra de diminuer les pollutions liées aux pratiques agricoles.

Parmi ces alternatives, l'utilisation des bactéries rhizosphériques promotrices de la croissance des plantes (PGPR), et les bactéries fixatrices de l'azote, ces microorganismes ont un effet direct sur la croissance des plantes en augmentant l'absorption des nutriments du sol, et en induisant et en produisant des régulateurs de croissance, ainsi via l'activation des mécanismes de résistance induite chez les plantes ; ou indirectement via leurs effets antagonisme impliquent la production d'antibiotiques et la compétition avec les pathogènes végétaux (Beauchamp, 1993).

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de l'inoculation des souches de *Pseudomonas* sp. sur le développement de petit pois (*Pisum sativum* L.), et de sélectionner des isolats indigènes à haut potentiel promoteur de la croissance des plantes. L'évaluation de potentiel symbiotique entre les bactéries fixatrices d'azote indigènes du sol et leur plante hôte après l'inoculation, est également parmi les objectifs visés lors de cette étude.

**Etude**  
**Bibliographique**

## 1. Généralité sur les légumineuses

Les légumineuses ou fabacées sont une famille des plantes dicotylédones, divisée en trois sous-familles Caesalpinioideae, Mimosoideae, et Papilionoideae (Doyle et Luckow, 2003), renferme 714 genres et plus de 18 000 espèces (Lewis *et al.*, 2015). Les légumineuses sont principalement cultivées comme source des protéines, pour la consommation humaine sous forme des graines (haricot, pois, pois chiche, fève ...) et l'alimentation animale (foin, ensilage, luzerne...), il existe plus de 40 espèces de légumineuse à graines cultivées dans le monde (Schneider et Huyghe, 2015).

Dans les systèmes agricoles, les légumineuses agissent comme une culture de rotation avec les céréales, dans le but de fertiliser le sol, de réduire les agents pathogènes et de fournir de l'azote aux cultures céréalières (Akibode et Maredi., 2012), à travers leur caractère symbiotique avec les bactéries du sol (les Rhizobia) (Giraud, 2007) ; les estimations montre qu'un hectare d'une légumineuse en symbiose avec ces bactéries fixe couramment de 25 à 60 kg d'azote par ans (Hopkins,2003).

### 1.1. Le petit pois (*Pisum sativum* L.)

#### 1. 1. 1. Généralité sur le petit pois (*Pisum sativum* L.)

Le pois (*Pisum sativum* L.) est une plante annuelle de la famille des Fabacées (Fabaceae). Les pois secs se présentent généralement sous la forme de "pois cassés". Les pois frais sont souvent appelés « pois » (Auger, 2007). Elle est considérée comme la deuxième légumineuse la plus cultivée au monde (Agrios, 1988). Les pois sont une excellente source de protéines de haute qualité à moindre coût (21% à 25%). Il contient également des niveaux élevés de glucides, de minéraux et de vitamines. A ce titre, il joue un rôle important dans l'équilibre nutritionnel masculin (Harmankaya *et al.*, 2010 ; Enderes *et al.*, 2016). De plus, comme les racines ont des nodules, qui fixent l'azote atmosphérique, la fertilisation azotée n'est pas nécessaire. Selon Janzenn *et al.*, (2014), le pois tolère bien les périodes de sécheresse.

#### 1. 1.2. Origine et répartition géographique de petit pois (*Pisum sativum* L.)

L'origine et les ancêtres *Pisum sativum* L. ne sont pas bien connus. La région méditerranéenne considère l'Éthiopie, l'Asie centrale et occidentale comme des centres d'origine. La FAO a identifié l'Ethiopie et l'Asie occidentale comme des centres de diversité, avec des centres mineurs en Asie du Sud et dans la région méditerranéenne (Grubben et

Denton, 2004). Il y a très longtemps, les pois ont été découverts comme restes de plantes qui ont été collectées ou domestiquées dans les sites archéologiques néolithiques de la Grèce à l'Irak entre 7500 et 5000 avant JC, après quoi la culture s'est étendue à l'est (Inde) et à l'ouest (Europe). Il y a environ 4000 ans, des traces en ont été retrouvées sur le site archéologique de Troie en Europe centrale mais aussi en Europe occidentale et en Inde, il y a environ 2000 ans (Cousin et Bannerot, 1992 ; Brink et Belay, 2006). La plante de pois est cultivée au printemps et sa consommation s'est étalée tout au long de l'année grâce aux techniques modernes de conservation (conservation et congélation), et elle possède de bonnes propriétés nutritionnelles (forte teneur en lysine) (Burger et Zhang, 2019).

### 1.1.3. Classification botanique de petit pois (*Pisum sativum* L.)

Le petit pois (*Pisum sativum* L.) est divisé en trois variétés botaniques : le pois anglais ou à écosser (*P. sativum* L. var. *sativum*), le pois mange-tout (*P. sativum* L. var. *macrocarpon*) et snap pois (*P. sativum* L. var. *saccharatum*) (Ram et al., 2021). Selon USDA (2008), la classification botanique pois (*Pisum sativum* L.) est la suivante :

**Règne :** Plantae

**Embranchement :** Spermatophyta

**Classe :** Magnoliopsida

**Ordre :** Fabales

**Famille :** Fabaceae : fabacées, papilionacées ou légumineuses

**Genre :** *Pisum*

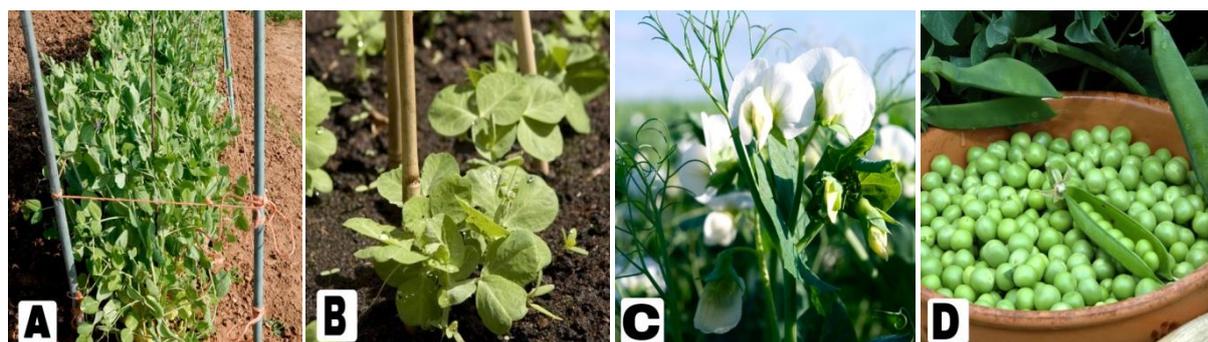
**Espèce :** *Pisum sativum* L.

### 1.1.4. Les caractéristiques botaniques de petit pois (*Pisum sativum* L.)

Le petit pois (*Pisum sativum* L.) est une plante herbacée annuelle grimpante, qui atteint une hauteur de (200-300 cm) (figure 1A), composée d'une racine principale et de racines secondaires cylindriques ramifiées à la base, sur lesquelles poussent des nœuds (Grubben, 2004). Les feuilles sont composées de 2 ou 3 paires de folioles ovales (figure 1B), opposée et asymétrique avec des courts pétioles (Polese, 2006 ; Nyabyenda, 2005).

La fleur de petit pois est solitaire ou regroupées (1-2 fleurs), elle est caractéristique des papilionacées et bisexuées (figure 1C), les fleurs généralement blanche à violette (Grubben, 2004), la fécondation se fait par autopollinisation (prat, 2007).

Les fruits de petit pois sont des gousses généralement oblongue-ovale d'une longueur de 3.5-15 cm x1-2.5 cm (figure 1D), qui contient des grains (2-11) (Grubben, 2004), les grains sont lisses ou ridés de couleur vert ou crème, orange brune ou violette, qui contient des cotylédons jaunes (Nyabyenda, 2005).



**Figure 01** : La plante de petit pois (*Pisum sativum* L.)

<https://jardinage.ooreka.fr/plante/voir/110/petit-ois>

A: la plant ; B: la feuille ; C: la fleure ; D: les fruits

### 1.1.5. La production de petit pois (*Pisum sativum* L.)

#### 1.1.5.1. La production mondiale de petit pois (*Pisum sativum* L.)

Le pois est la légumineuse la plus cultivée et la plus consommée au monde (Sarikamis *et al.*, 2010). Selon les statistiques de la FAO en 2019 le petit pois se classe au quatrième rang des légumineuses au niveau après le soja, l'arachide et l'haricot. La production de pois secs s'est élevée à 14 184249 millions de tonne pour une surface de 7166876 million hectare, soit un rendement de 19791 hg/ha, et la production de pois frais dans la même année est de 200025 tonnes avec une surface cultivée de 38959 hectare, soit un rendement de 51342 hg/ha (FAOSTAT, 2019). Le graphique ci-dessous (figure 02) montre la superficie et la production de certains pays.

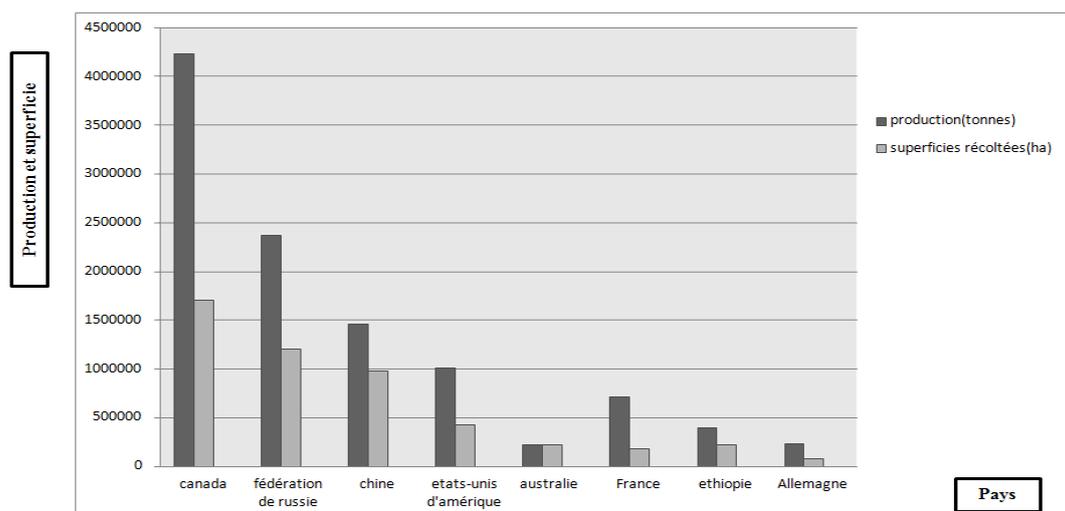


Figure 02 : La production de petit pois dans certains pays européens (FAOSTAT, 2019).

<http://www.fao.org/statistics/fr/>.

### 1.1.5.2. La production de petit pois en Algérie

Le petit pois c’est une légumineuse alimentaire annuelle consommée en Algérie surtout en frais, et le genre de *Pisum* c’est le plus représentant dans la flore algérienne (Djekoun, 2017). Le pois est principalement cultivé à Biskra (irrigué), Tipaza, Boumerdes, Mostaganem et Tlemcen (sec), c’est une culture contrôlée manuellement. La variété *Merveille de Calvedon* est plus répandue en Algérie (<https://agrichem.dz>), selon les statistique de direction des statistique agricole et des systèmes d’information, dans les dernières années, wilaya de Tlemcen s’est classée en premier position pour la production de petit pois (figure 03).

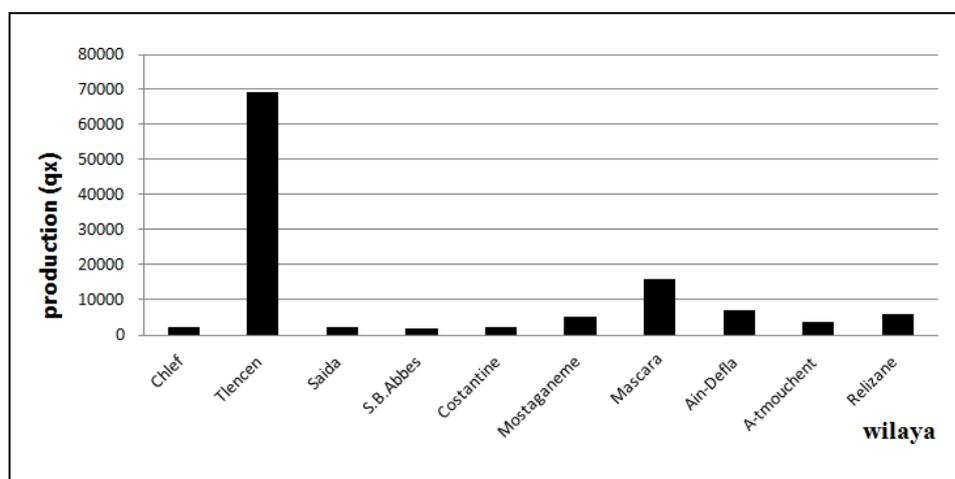


Figure 03 : La production de petit pois en Algérie en (2019)

<http://madr.gov.dz>

### 1.1.6 .Cycle de développement de petit pois (*Pisum sativum* L.)

Le cycle végétatif normal est de 65 à 100 jours pour les pois frais et de 20 jours de plus pour les pois secs (figure 04). Sous les climats frais, il est plus long (Doorenbos et Kassam, 1987). Le cycle développement du petit pois comprend deux périodes : période végétative et période reproductrice :

#### 1.1.6.1. Période végétative

##### a. La germination

La germination est l'ensemble des événements qui commencent par l'étape cruciale d'absorption de l'eau par la graine (Bradford, 1995), et se terminent par l'élongation de l'axe embryonnaire et l'émergence de la radicule à travers les structures qui entourent l'embryon (Bewley, 1997). La croissance des plantes peut être déterminée en fonction du temps thermique, c'est-à-dire du nombre de degré jours qui correspond à la somme des différences entre la température moyenne de chaque jour et la température du zéro végétatif, le zéro de végétation du *Pisum sativum* L, est de 0C°, sous cette température la plante stoppe sa croissance (Prat, 2007).

##### b. Stade végétatif

La croissance végétative se poursuit avec l'apparition des premiers boutons floraux. L'établissement des fruits sur la plante entraîne un ralentissement progressif de l'activité végétative. En mûrissant, les fruits mobilisent de plus en plus d'assimilés issus de la photosynthèse, au détriment du développement végétatif (Laussou, 2008).

#### 1.1.6.3. Période reproductrice

##### a. Floraison

La période de floraison précoce est une période clé pour la croissance du pois. Elle correspond au début de la phase de reproduction. Un peuplement est au début de la floraison lorsque 50 % des tiges sont en fleurs. Elle est considérée comme fleurissante lorsqu'il y a au moins une fleur bien établie sur la tige (Jolain *et al.*, 2005). Le délai entre le semis et la floraison est d'environ 45 jours (Yves, 2006). La fécondation est principalement auto-associée (Griffiths *et al.*, 2002).

## b. Formation des gousses et graine

La transition du stade de floraison au stade de formation des gousses n'est pas bien définie et la formation des gousses se produit rarement à partir de la première fleur, c'est-à-dire à l'aisselle des feuilles de la première feuille. L'émergence des gousses se produit 10 ou 15 jours après le début de la floraison (Rihane, 2005).



**Figure 04 :** Le cycle de développement de petit pois (*Pisum sativum L.*)

<https://media.istockphoto.com>

## 2. Les PGPR « Plant Growth Promoting Rhizobacteria »

La première introduction du terme «PGPR» est apparue à la fin des années 1970, démontrée par Kloepper et Schroth, où les souches de *Pseudomonas fluorescens* ont contribué à l'amélioration du rendement de la pomme de terre en produisant des sidérophores et des chélateurs de fer, privant les bactéries pathogènes indigènes de fer (Garcia *et al.*, 2003). Le terme PGPR provenant de l'anglais « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » (Kloepper *et al.*, 2004) désigne comme des bactéries Rhizosphériques qui colonisent compétitivement les racines des plantes par utilisation des exsudats racinaires comme substrats nutritifs (Vacheron *et al.*, 2013). Ces bactéries contribuent positivement à développer la croissance des plantes par plusieurs moyens, elles se caractérisent par leur rôle important dans la multiplication et être compétitives vis-à-vis des autres micro-organismes (Dey *et al.*, 2004). Ces bactéries peuvent exister au niveau extracellulaire (PGPRE) ou intracellulaire (PGPRI) dans la

rhizosphère (Gray et Smith, 2005), ces bactéries ont été classées en différents groupes taxonomiques de bactérie appelées les rhizobactéries qui favorisent la croissance des plant (RFPC), ces derniers les plus commun identifiées sont : *Pseudomonas fluorescences*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Rhizobium* et des *serratia* spp (Bakker *et al.*, 1991 ; kloepper, 1992).

## 2.1. Effets des PGPR

### 2.1. 1. Effet direct des PGPR

Les PGPR favorisent directement la croissance des plantes en aidant à acquérir des ressources (azote, phosphore et minéraux essentiels) ou en régulant les niveaux de phytohormones (Munees et Mulugeta, 2014).

#### 2.1. 1.1. Solubilisation de phosphore

Le Phosphore est le deuxième élément alimentaire important pour une meilleure croissance et le développement des végétaux (Goudaa *et al.*, 2018), Il dispose de sa participation de base à diverses métaboliques biologiques y compris la respiration et la photosynthèse, la biosynthèse et le transfert d'énergie (Anand *et al.*, 2016). Le phosphore est présent dans le sol à 95% à 99% sous des formes insolubles, immobilisée et précipitée, et donc les plantes sont difficilement assimilables, sauf sous seulement deux formes solubles les ions monobasique ( $H_2PO_4$ ) et basique ( $HPO_4^{2-}$ ) (Govind *et al.*, 2015). Certaines études ont montré qu'il existe dans le sol des microorganismes capables de dissoudre le phosphore insoluble en phosphore soluble comme *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Enterbacter*, *Proteus*, *Klebsiella* et *serratia* (Gupta *et al.*, 2012 ; Panhwar *et al.*, 2013).

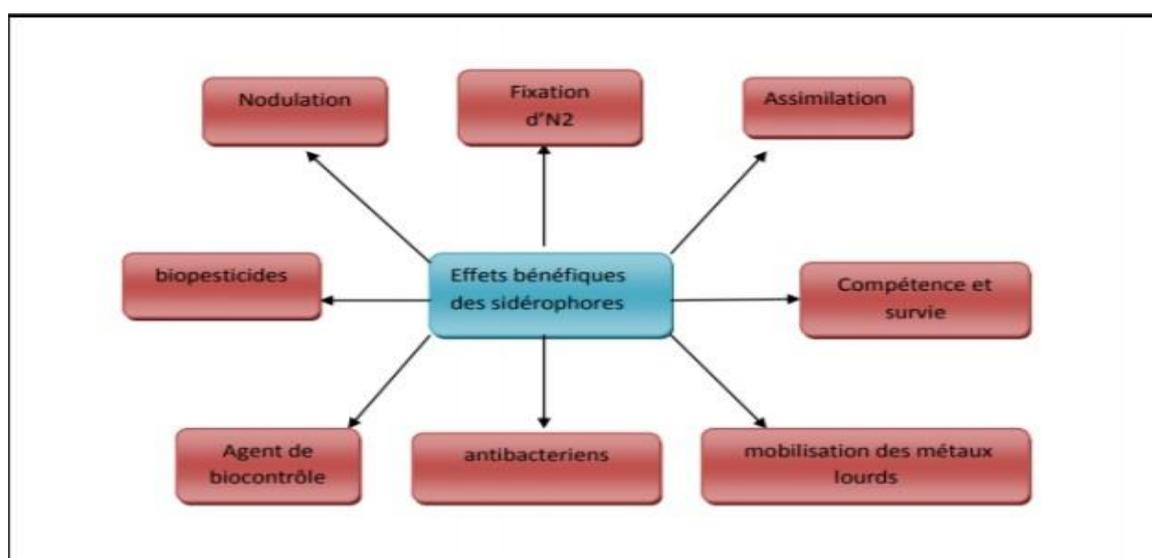
#### 2.1. 1.2. Production des siderophore

Le fer est l'un des éléments les plus existe et les plus abondants à la surface de la terre qui joue un rôle actif dans la croissance et le développement de la plante en particulier, la fixation de l'azote, nodulation, respiration et photosynthèse aussi la moins assimilable par les plantes (Taylor et Konhauser, 2011) (figure 05).

Les siderophore (sidéro = fer ; phoros = transport) (Rossum *et al.*, 1994), sont des composés chélatants du fer, les micro-organismes contribuent à sa production et à sa sécrétion notamment pour leur permettre de puiser le fer essentiel à leur développement. Ces composés se caractérisent par leur faible poids moléculaire (généralement inférieurs à 1 Kda) avec une très forte affinité pour l'ion  $Fe^{3+}$  (Kuffner *et al.*, 2008). L'isolement de première sédirophe par

*Aerobacter aérogènes* qui s'appelle l'aérobactine et presque 500 structures de sidérophores sont connues jusqu'ici (Gibson et Magrath, 1969 ; Boukhalifa et Crumbliss., 2002).

Plusieurs bactéries peuvent le produire *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Azospirillum*, *Rhizobium* et *Bacillus* (Syed et Vidhale, 2013). Il est également a signalé que les siderophores peuvent être synthétisés par les plantes (monocotylédones) et les champignons (Ferret, 2012). La chélation du fer est un phénomène participatif combattre efficacement les pathogènes des plantes en réduisant leurs populations par terre (Kirdi et Zermane, 2010).



**Figure 05:** Fonctions biologiques des sidérophores (Khan *et al.*, 2009).

### 2.1. 1.3. Production des phytohormones

Un large éventail de microorganismes dans le rhizosphère sont capables de favoriser une bonne croissance des plantes en produisant des phytohormones (Arora , 2013 ) , ces phytohormones sont des substances organiques naturelles utilisées comme messagers chimiques pour communiquer les activités cellulaires des plantes supérieures , elles sont produites à très faible concentration, ces dernières participent à divers processus physiologiques ainsi qu'à la régulation des stimuli internes et externes (Wani *et al.*, 2016 ; Agueniou *et al.*, 2017). Il existe différentes hormones végétales qui régulent les différentes étapes du développement des plantes tel que l'auxine, les cytokinines, les gibbérélines, les acides abscissiques et l'éthylène (Kang *et al.*, 2015).

### a. Les cytokinines

Les cytokinines sont un groupe de dérivés d'adénine N 6-substitués (Argueso *et al.*, 2012) qui contribuent à la résistance des plantes aux maladies et participent à de nombreux processus biologiques tel que le développement vasculaire, des parties latéraux des pousses et des racines, la division et la différenciation cellulaires, l'embryogenèse, l'architecture des racines et des pousses (Ashraf, 2020 ; Choi *et al.*, 2010). D'autre part, les cytokines produisent une protéine qui facilite l'expansion des cellules végétales et augmente la relaxation des parois cellulaires végétales, ce qui affecte la taille et la forme des cellules (Downes *et al.*, 2001). Un groupe de bactéries est impliqué dans la production de cytokinines comme *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Escherichia* et *Agrobacterium* (Maheshwari *et al.*, 2015). L'utilisation de ces derniers dans l'inoculation des graines augmente mieux le développement et la croissance de la plante (Arkhipova *et al.*, 2007).

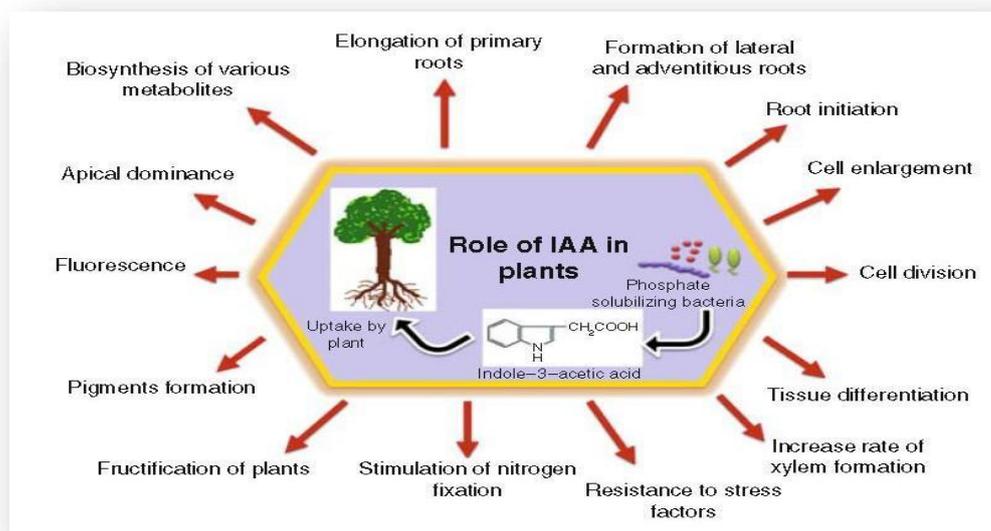
### b. Les gibbérellines

Les gibbérellines sont des acides diterpénoïdestétracycliques d qui participe grandement à la plupart des étapes de croissance et de développement de la plante y compris l'expansion des feuilles et la maturation des fruits, l'élongation de la tige, la germination des graines, la floraison, la croissance des racines et l'abondance des poils des racines. De plus, il se caractérise par sa capacité à réguler le temps de transition vers la floraison (Binbaum *et al.*, 2018 ; Bottini, 2004). Ces phytohormones jouent un rôle efficace dans la diminution du stress thermique (Kang *et al.*, 2015). *Rhizobium méniloti* est la première bactérie qui a été prouvée par la production de cette hormone végétale puis chez différents genres bactériens *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Burkholderia*, et *Xanthomonas* (Joo *et al.*, 2009).

### c. Acide Indole Acétique (AIA)

L'Acide Indole-3-Acétique est l'hormone végétale la plus connue et la plus fondamentale produites par les plantes et les PGPR qui participe à la plupart des étapes de croissance et de développement des plantes par exemple tels que la germination des graines, l'initiation des racines, la division, la résistance des plantes au stress et l'élargissement cellulaire (Vessey, 2003) (figure 06). Plus de 80% des bactéries qui ont produit ce type d'hormones, on retrouve les genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Enterobacter* et *Bacillus* (Yuan *et al.*, 2003). Il joue un rôle actif pour améliorer la survie de

la bactérie dans la rhizosphère. En outre, il est impliqué dans la stimulation de la croissance des plantes en réduisant l'influence des bactéries grâce à son effet sur les racines (Kloepper *et al.*, 2004). Il existe plusieurs facteurs environnementaux affectant la biosynthèse de l'AIA. Plus spécifiquement, augmentation de sa production sur le cas en présence de plus grandes quantités de tryptophane et dans des conditions de pH élevé (Spaepen *et al.*, 2009).



**Figure 06:** L'importance de l'AIA dans l'amélioration de la croissance végétale (Moustaine *et al.*, 2017)

## 2.1. 2. Effet indirect des PGPR

### 2.1. 2.1. Production des antibiotiques

La production d'antibiotiques par des microorganismes impliqués dans le contrôle biologique des agents pathogènes des plantes est reconnue depuis longtemps comme un mécanisme important qui contribue à l'atténuation des symptômes de la maladie, en particulier dans les conditions du sol (Fravel, 1988 ; Handelsman et Stabb, 1996 ; Whipps, 2001 ; Raaijmakers *et al.*, 2002 ; Haas et Defago, 2005). Dans ce contexte, le terme action antibiose fait référence au mécanisme par lequel les antibiotiques produits par des microorganismes sont capables de contrôler les agents pathogènes des plantes et les maladies qu'ils provoquent. De nombreux autres mécanismes de contrôle biologique, y compris la compétition pour l'espace et les nutriments, l'induction de la résistance systémique des plantes et le parasitisme, ont également été identifiés et peuvent fonctionner en conjonction avec la

production d'antibiotiques d'agents de contrôle biologique spécifiques (Handelsman et stabb, 1996).

Une très large gamme d'antibiotiques a été trouvée produite par les PGPR, y compris ceux produits par *Pseudomonas*, tels que l'amphotéricamine, le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), le cyanure d'hydrogène, l'oomycine A, la phénazine, la pyocyanine, la pyrrolnitrine, la tensine. Tropolone et cyclolipopeptides (De Souza *et al.*, 2003).

### **2.1. 2. 2. Production au cyanure d'hydrogène HCN**

Le cyanure d'hydrogène (HCN) est un métabolite secondaire faisant partie du cyanure. Il peut être produit directement à partir de glycine ou de glycosides cyanogéniques (Bakker et Schippers, 1987). La glycine est un acide aminé considéré comme le meilleur précurseur pour la production de cyanure dans les micro-organismes (Askeland et Morrison, 1983). Le PGPR produit du HCN par ses effets sur les maladies des racines L'antagonisme de la plante assure un effet bénéfique sur la plante (Defago et Haas, 1990).

### **2.1. 2.3. Les composés volatiles**

Les COV améliorent indirectement la croissance des plantes en atténuant les stress biotiques et abiotiques. Les émissions de COV impliqués dans les mécanismes de défenses des plantes sont une caractéristique commune à un grand nombre de PGPR. Parmi les composés identifiés impliqués dans ces mécanismes de défenses, on retrouve des composés tels que le cyclohexane, le 2-(benzyloxy)éthanamine, le benzène, le méthyle, le décane, le 1-(N-phénylcarbamyl)-2-morpholinocyclohexène, le dodécane, le benzène(1-méthylnonadécyl), le 1-chlorooctadécane, le tétradécane, le 2,6,10- triméthyle, le dotriacontane, le 11-décylodocosane. La composition des COV varient selon les espèces (Kanchiswamy *et al.*, 2015). Certains COV tels que le diméthyl disulphide et le 2- méthyl-pentanoate sont hautement toxiques pour les agents phytopathogènes (Groenhagen *et al.*, 2013 ; Cordovez *et al.*, 2015 ; Raza *et al.*, 2016 ; Ossowicki *et al.*, 2017). Certains COV tels que l'acétoïne, le 2,3- butanediol et le tri-décane sont capables d'induire le mécanisme d'ISR contre ces agents pathogènes (Lee *et al.*, 2012).

### **2.1. 2.4. La résistance systémique**

Certains PGPR sont capables d'améliorer les performances des plantes en activant la résistance systémique de ces dernières, leur conférant ainsi une résistance à large spectre à de nombreux pathogènes et insectes (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003 ; Ryu *et al.*, 2004 ; Bakker *et al.*, 2007 ; van Wees *et al.*, 2008 ; Hayat *et al.*, 2010). Il existe deux types de

résistance systémique: la résistance acquise et la résistance induite. La résistance systémique acquise (SAR) est basée sur la synthèse végétale d'acide salicylique, conduisant à des protéines associées à la pathogénèse (Persello Cartieaux *et al.*, 2003; van Loon *et al.*, 2006 ; van Wees *et al.*, 2008). Un autre mécanisme est la résistance systémique induite (ISR). Contrairement au SAR, l'ISR ne dépend pas de l'acide salicylique, mais de l'acide jasmonique et de l'éthylène. L'ISR est normalement induite lors de l'interaction avec des rhizobactéries non pathogènes et conduit à l'activation de gènes impliqués dans les mécanismes de défense, conférant une réponse plus rapide et efficace lorsqu'ils sont attaqués par des agents pathogènes (van Loon *et al.*, 2006).

### 3. *Pseudomonas* sp.

Le genre *Pseudomonas* a été décrit pour la première fois par Migula en 1894, appartient au phylum des *Proteobacteria*, classe des *Gammaproteobacteria*, ordre des *Pseudomonales*. Actuellement, les bactéries du genre *Pseudomonas* correspondent à des bacilles à Gram négatif, droites fins, aux extrémités arrondies, d'une taille moyenne de 2 sur 0,5 µm (Palleroni, 1984), strictement aérobies, généralement mobiles grâce à des flagelles en positions polaires (uni-ou multi-poil) (figure 07), chimiotaxie, métabolisme oxydatif, catalase positive et oxydase positive, sauf pour les espèces phytopathogènes du « complexe *Pseudomonas syringae* ». Ces souches sont facilement cultivées sur des milieux courants, comme la gélose nutritive, et se développent entre -1°C (Yumoto *et al.*, 2001) et +55°C (Manaia et Moore, 2002).

D'un point de vue taxonomique, les *Pseudomonas* fluorescents sont très complexes (Stanier *et al.*, 1966). Le genre comprend *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida* et plus récemment *P. protegens* ainsi que des espèces phytopathogènes telles que *P. cichorii* et *P. syringae* (María Lis Yanes, 2016). Ces espèces bactériennes sont principalement des microorganismes saprophytes d'origine terrestre et aquatique (Alquati *et al.*, 2002). La substance « fluorescente » est caractérisée par la production de pyrrolidine, un pigment fluorescent jaune-vert avec une longueur d'onde d'excitation maximale de 370 nm. Ces pigments sont synthétisés en grande quantité dans des conditions de culture carencées en fer (Meyer, 1977).

*Pseudomonas fluorescens* agit comme un PGPR et produit plusieurs niveaux de substances favorisant la croissance des plantes telles que l'acide indole-3-acétique (AIA)

(Ricci *et al.*, 2019), les enzymes de désamination de l'aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) (Win *et al.*, 2018), qui dissolvent le phosphate insoluble (Naik *et al.*, 2008).

*Pseudomonas fluorescents* est connu depuis longtemps pour sa capacité à réduire l'incidence des maladies racinaires dans certains champs et à inhiber la croissance d'un certain nombre de phytopathogènes in vitro (Allaire, 2005).



**Figure 07:** Micrographie électronique à transmission en fausses couleurs de bactéries aérobies du sol *Pseudomonas fluorescent* (SciencephotoLibrary).

### 3.1. Taxonomie de *Pseudomonas* sp.

D'après Moore *et al.*, (2006), la classification de *Pseudomonas* sp. est comme suit :

**Domaine** :Bacteria.

**Phylum** : Protéobacteria.

**Classe** : Gamma-protéobacteria .

**Ordre** : Pseudomonadales.

**Famille** : Pseudomonadaceae.

**Genre** : *Pseudomonas*

### 4. La symbiose rhizobium-légumineuses

Les *Rhizobiums*, ou Rhizobia, sont des bactéries aérobies du sol appartenant à la famille des Rhizobiaceae (Sahgal et Johri, 2006), ces bactéries sont capables d'obtenir des nodules sur les racines et/ou les tiges des légumineuses, où les bactéries sont capables de fixer l'azote. Il comprend les genres suivants : *Allorhizobium*, *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*,

*Cupriavidus*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, *Neorhizobium*, *Pararhizobium*, *Shinella* (El Idrissi, 2020).

La symbiose *rhizobium*-légumineuse est une source importante d'azote fixe (ammoniac) dans la biosphère, le processus à le potentiel d'augmenter les rendements agricoles tout en réduisant la dépendance engrais azoté (George, 2018).

Ces symbioses contribuent fortement à la nutrition azotée de ces plantes et donc à leur développement, notamment sur les sols carencés en azote. L'établissement de ces symbiotes commence par un dialogue moléculaire, qui forme alors des structures appelées nodules ou nodosités, qui sont des lieux d'échange entre les deux partenaires (Diedhiou *et al.*, 2022).

#### 4.1. La fixation biologique de l'azote

L'azote est le nutriment le plus important pour la croissance et le développement des plantes (Aerts et Chapin, 1999 ; Ahemad et Kibret, 2014). Bien qu'il constitue 78 % de l'atmosphère, aucune espèce végétale n'est capable de fixer le diazote atmosphérique ( $N_2$ ) pour sa croissance. Les espèces végétales ne peuvent assimiler l'azote que sous forme d'ammonium ( $NH_4^+$ ) et de nitrate ( $NO_3^-$ ). Le  $N_2$  est converti en une forme utilisable par les plantes ( $NH_4^+$ ) par un processus biologique de fixation de l'azote appelé diazotrophie. Ce processus est réalisé par des micro-organismes fixateurs d'azote à l'aide d'un système enzymatique complexe appelé nitrogénase (Kim et Rees, 1994).

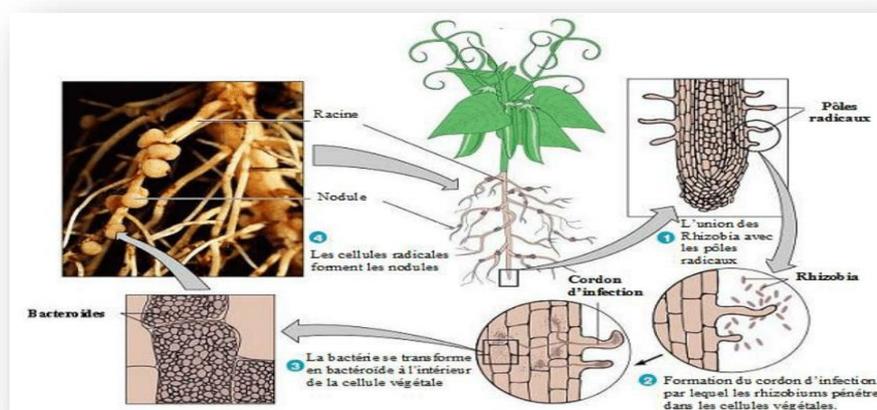
Les bactéries fixatrices d'azote ont la capacité de piéger l'azote atmosphérique et de le fournir aux plantes par deux mécanismes symbiotiques et asymbiotiques. La fixation symbiotique de l'azote est une relation mutualiste entre les bactéries et les plantes. Les bactéries pénètrent d'abord dans les racines, qui forment ensuite des nodules où se produit la fixation de l'azote. Les rhizobiums sont un grand groupe de bactéries *Rhizobium* capables d'établir des interactions symbiotiques en colonisant et en formant des nodules dans les plantes, où l'azote se lie à l'ammoniac et le rend disponible pour l'hôte (Munees et Mulugeta, 2014).

### 4.1.1. Les étapes de la nodulation

La nodulation chez les légumineuses est un phénomène très courant, sur les 20% de légumineuses étudiées, 90% des espèces de *Mimosoideae* (robinier, glycine, acacia... etc.), 97% des espèces de *Papilionaceae* (pois, haricots, fèves, lentilles, etc.), et 30% de Flamboyant (flamboyant, Barbade, séné d'Alexandrie...etc.) peuvent être nodulés par des rhizobiums spécifiques (Doyle et Luckow, 2003).

Les *Rhizobiums* fixent l'azote dans les nodules racinaires, qui sont le résultat d'un dialogue moléculaire entre le *Rhizobium* et la plante hôte (Dénarié *et al.*, 1996) (figure 08). Les racines des légumineuses sécrètent des flavonoïdes spécifiques qui peuvent être reconnus par les rhizobiums grâce à la protéine NodD (Spaink, 1995). Ces protéines réceptrices activent la transcription des gènes de nodulation (*nod*) situés sur des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides (Downie, 2010).

La reconnaissance des facteurs Nod par les récepteurs végétaux déclenche la formation de nodules racinaires. Le squelette des facteurs Nod est codé par le gène *nodABC*, tandis que les autres gènes Nod et les gènes *noe* et *nol* codent la « décoration » moléculaire qui détermine la spécificité de l'hôte (Perret *et al.*, 2000). La reconnaissance des flavonoïdes par les facteurs NodD et Nod par les récepteurs végétaux fait partie d'une série d'étapes appelées « clé et serrure ». Les hôtes légumineuses peuvent utiliser ces étapes pour évaluer les partenaires de rhizobium compatibles potentiels (Perret *et al.*, 2000) et pour sélectionner activement les génotypes de rhizobium (c'est-à-dire la sélection du partenaire avant l'infection) (Gubry-Rangin *et al.*, 2010 ; Sachs *et al.*, 2010).



**Figure 08:** Les étapes de la nodulation  
[www.researchgate.net](http://www.researchgate.net)

# **Matériel et Méthodes**

Ce travail a été réalisé au sein de laboratoire du département de Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Tissemsilt durant la période (février-mai 2023).

### 1. Isolats bactériens (*Pseudomonas* sp.)

Les isolats de *Pseudomonas* sp. utilisés lors de cette expérience obtenus de la collection de laboratoire pédagogique de département de Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Tissemsilt, les souches de ont été isolées à partir du sol rhizosphérique de la fève par la technique de dilution (annexe01).

#### 1.1. Purification des souches

La purification des isolats a été réalisée par un repiquage successif (figure 09) sur milieu King A, un milieu sélectif utilisée pour la caractérisation des *Pseudomonas* (King *et al.*, 1954) (Annexe 02), les boîtes de pétri sont ensuite incubées à 30°C pendant 24-48 heures. L'opération est répétée plusieurs fois afin d'obtenir des souches pures et bien isolées.



**Figure 09:** Purification de souches des isolats

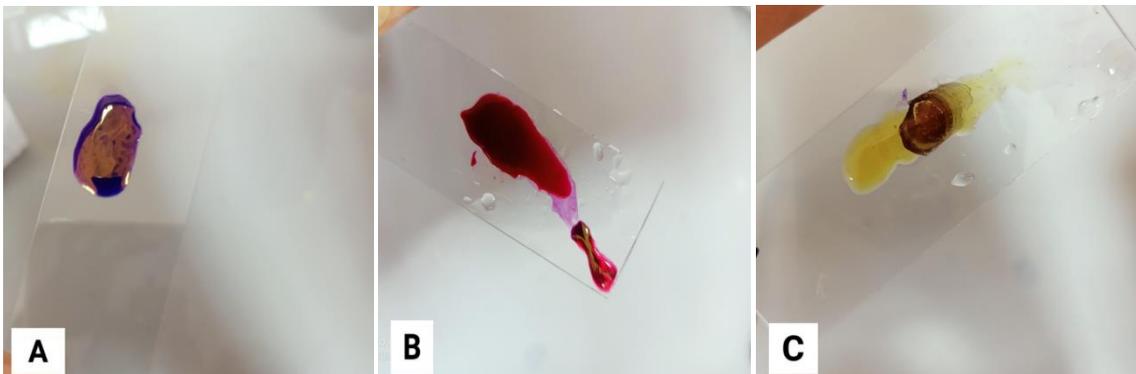
##### 1.1.1 Examen macroscopique

L'examen macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur le milieu utilisé en tenant compte des critères suivants : la taille, la forme, et la couleur des colonies (Guiraud, 2003).

### 1.1.2. Examen microscopique

L'examen microscopique a été effectué sur un frottis bactérien, préparé à partir des colonies suspectes en cultures pures, puis fixé et coloré par la méthode de Gram. La coloration de Gram, du nom du bactériologiste danois HANS CHRISTIAN GRAM qui a mis au point le protocole en 1884, est la première étape de l'identification complète des bactéries en microbiologie médicale. C'est une coloration qui met en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, qu'elle soit Gram-positive ou Gram-négative (PRESCOTT *et al.*, 2003).

Le frottis est coloré en violet de Gentiane (annexe 03) ou cristal violet pendant 1 minute, puis en lugol pendant 1 minute (annexe 04). Une décoloration a été effectuée par la suite en l'alcool pendant 30 secondes jusqu'à la disparition du violet puis rincer abondamment par l'eau distillée. La lame est recouverte par la suite de fuchsine (annexe 05) pendant une minute, puis rincer à l'eau et sécher entre deux feuilles de papier absorbant. Les lames par la suite, sont observées sous microscope à un grossissement (X 1000), une goutte d'huile d'immersion est ajoutée au-dessus de la lame pour déterminer le type de la bactérie: si les cellules sont colorées en violet (Gram positives) ou bien en rose (Gram négative) (figure10)



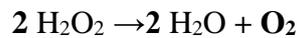
**Figure 10** : Les étapes de coloration de gram  
A : violet de Gentiane, B : lugol, C : fuchsine

## 1.2. Etude des enzymes respiratoires

### 1.2.1. Test catalase

La catalase est une enzyme détruisant l'eau oxygénée  $H_2O_2$  avec libération d'oxygène. Révéler la présence de catalase en déposant des colonies bactériennes (prélever du milieu de

culture) dans une goutte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur une lame. Une réaction positive conduit à des bulles lorsque de l'oxygène gazeux est libéré (Marchal *et al.*, 1991).



### 1.2.2. Test oxydase

Le test consiste à mettre en évidence la présence de ce cytochrome une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes. Une colonie bien isolée prélevée est étalée sur le disque imbibé de réactif oxydase imprègnés du réactif (oxalate de N di ou tétraméthyl- paraphenyl diamine) (Jurtshuk et Mcquitty, 1976). Une couleur violette après 10 secondes indique une réaction positive, une absence totale de couleur indique un test négatif (Kovacs *et al.*, 1995).

### 1.3. Galerie API 20 NE

L'identification a été effectuée par la galerie rapide API système (bio Mérieux, Marcy-L'étoile, France). La galerie API 20NE est un système standardisé pour l'identification des bactéries Gram-négatives non-entérobactéries telles que *Pseudomonas*, le système comprend 20 microtubules (figure 11) contenant des substrats déshydratés.

Huit tests conventionnels ont été inoculés avec une suspension bactérienne saline d'opacité égale à 0,5 de McFarland (annexe 06). Les autres tests ont inoculés avec un milieu minimum. Les réactions produites durant la période de l'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture se fait à l'aide du tableau de lecture (Annexe 07) et l'identification est réalisée à l'aide de catalogue analytique, ou à l'aide du logiciel d'identification (APIWEB™).



**Figure 11** : Inoculation de la galerie API 20 NE

### 1.4. Antibiogramme

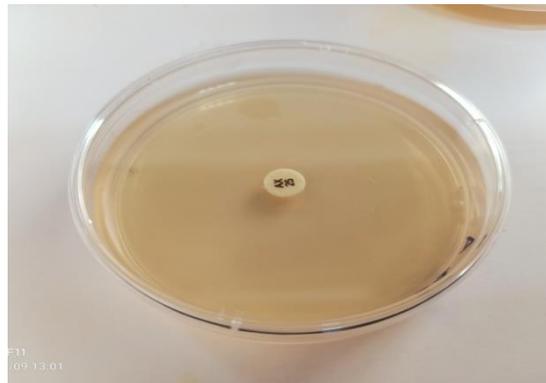
L'antibiogramme est un test *in vitro* conçue pour tester la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques suspecté ou connu. Cette sensibilité ou résistance aux *antibiotiques* est évaluée par la détermination de la *CMI*. (*Concentration minimale inhibitrice*) (Jehl *et al.*, 2015). Les boites de pétri contenant la gélose Mueller-Hinton (annexe08) ont été ensemencées par une suspension bactérienne standardisé (Mc Farland 0,5) à tester, ensuite les disques d'antibiotiques (tétracycline 30 µg, cyrpfloxacin 5µg, Gentamicine 10 µg, Amoxicilline 20 µg), sont déposés sur la gélose aseptiquement (figure 12). Les boites par la suite ont été incubées à 37°C pendant 24h, les diamètres d'inhibition autour des disques sont mesurés (Ponce *et al.*, 2003).

Résistante (-) : diamètre < 8 mm ;

Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm

Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm

Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm



**Figure 12 :** Antibiogramme réalisé sur les souches testées

### 1.5. Conservation des souches

La conservation vise à préserver un ensemble de traits morphologiques, métaboliques, génétiques et physiologiques inchangés des isolats, les colonies pures sont repiquées sur gélose inclinée, puis incubé pendant 24 à 48heurs à 30°C, puis conservés à 4°C pendant plusieurs semaines (figure 13).



**Figure 13** : La conservation des souches sur gélose inclinée

## 2. Culture et inoculation des plantules "in vitro"

D'après Joudi, (1992) les bactéries rhizosphériques de genre *Pseudomonas* jouent un rôle actif dans l'amélioration de la croissance des plantes et même sur les propriétés physique et chimique du sol. Cette expérience nous permet d'évaluer l'effet des bactéries isolées sur le développement et la croissance de petit pois. Les graines de petit pois (*Pisum sativum* L.) utilisés sont des graines commercialisées (figure14).



**Figure 14** : Les graines de petit pois (*Pisum sativum* L.) utilisées dans l'essai

### 2.1. Echantillonnage de sol

Nos échantillons de sol ont été prélevés dans la ville de Tissemsilt. Les analyses physico-chimiques de sol (granulométriques) et chimiques (carbone, pH, conductivité, matière organique, Azote, phosphore, ...) ont été effectuées au laboratoire agronomique FERTIAL (Annaba). Ces analyses physico-chimiques permettant d'estimer la fertilité naturelle de sol étudiée (Soltner, 2005), et de rechercher d'éventuelles corrélations entre la présence, l'absence et l'abondance des bactéries fixatrices d'azote et les PGPR.

## 2.2. Germination aseptique des graines

Les graines de petite pois (*Pisum sativum* L.) sont désinfectées à l'hypochlorite de sodium (12°) pendant 5 min, puis rincées 6 à 07 fois à l'eau distillée stérile afin d'éliminer les traces du désinfectant. Les graines ont été transférées dans des boîtes de pétri (figure15) contenant de l'eau gélosée (annexe09).



**Figure 15:** Les graines de petit pois (*Pisum sativum* L.) avant et après la germination  
Dans l'eau gélosée

## 2.3. Inoculation des souches (cas de *Pseudomonas*)

Les graines bien germées ont été transférées dans des pots contenant le sol échantillonné, l'inoculation consiste en sept traitements répétés six fois, y compris: les souches isolées (S1,S2,S6,S7,B1,B2,B4) et un témoin sans inoculation, en comparant la turbidité du milieuensemencé avec celle de McFarland 0,5, après chaque pot est inoculé par 1ml d'une suspension liquide de chaque souche à une concentration de  $10^8$  (UFC)  $\text{ml}^{-1}$  (Valverde *et al.*, 2006) (figure 16), les plantes ont été arrosées quotidiennement.

Les plantes doivent être déterrées quand des différences très nettes sont visibles entre les plantes. Les nodules formés au niveau des racines, ont été détachés et comptés afin d'estimer le pouvoir symbiotique, puis conservés sec dans des tubes contenant du  $\text{CaCl}_2$  (Vincent, 1970). L'efficacité des souches est également estimée par la comparaison de la longueur racinaire et aérienne, ainsi le poids frais et sec et le nombre des nodules des plantes inoculée avec les témoins non inoculés (le Poids sec est mesuré après séchage des plantes 24 h à 70°C).



**Figure 16 :** Test d'inoculation des plantes de petit pois (*Pisum sativum* L.) sous des conditions semi contrôlées

#### 2.4. Etude statistique

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel IBM SPSS STATISTACS (version 20). Analyse de la variance à un facteur (effet souche sur le nombre de nodules formés : effet souche sur la croissance – poids frais et sec des plantes, longueur racinaire et aérienne), le seuil de la probabilité utilisé pour déterminer la significativité est  $P \leq 0.05$ .

# **Résultats et Discussions**

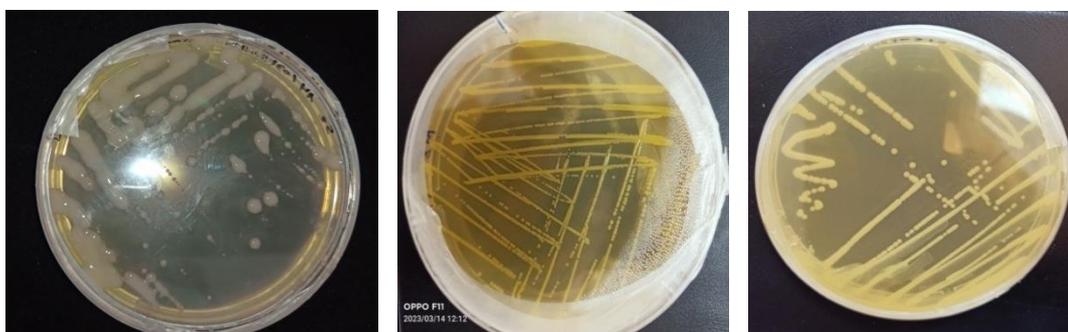
## 1. Isolats bactériens (*Pseudomonas* sp.)

### 1.1. Examen macroscopique

Après une incubation pendant 24 à 48h à 30°C, une observation macroscopique permet de déterminer la couleur, la taille, la forme, le contour des colonies, ainsi que la pureté des souches (Guiraud, 2003). Les colonies sont apparues homogènes sur King A, circulaires, avec des surfaces lisses et visqueuses, à un contour régulier et une taille moyenne (figure 17), de couleur Beige, crèmeuse, ou jaune peu fluorescent, le développement du pigment fluorescent a été révélé à l'œil nu ou sous UV (254 et 366nm). L'ensemble des résultats sont illustrés dans le tableau suivant (tableau 01).

**Tableau 01** : Caractéristiques morphologiques des colonies après 24h d'incubation à 30°C.

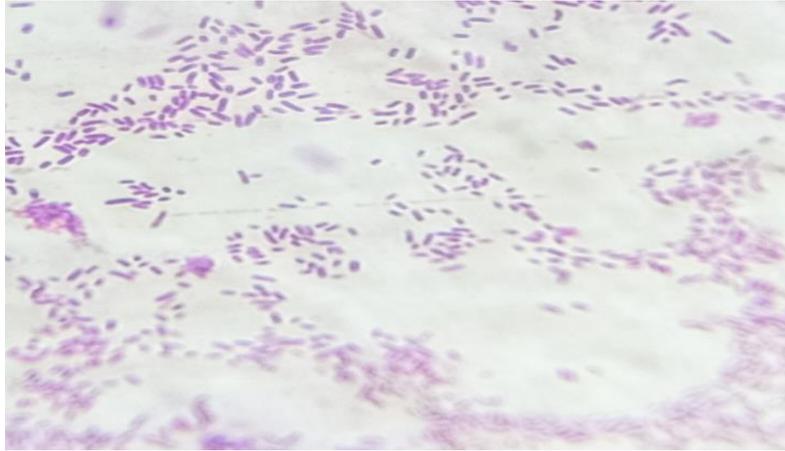
Caractères Souches	Contour	Relief	Couleur	Aspect	Forme
S1	Régulier	Plate	Jaune	Lisse et visqueuse	Circulaire
S2	Régulier	Bombée	Crème	Lisse et visqueuse	Circulaire
S6	Régulier	Plate	Beige	Lisse	Circulaire
S7	Régulier	Plate	Jaune	Lisse	Circulaire
B1	Régulier	Plate	Jaune	Lisse	Circulaire
B2	Régulier	Demi-bombée	Beige	Lisse	Circulaire
B4	Régulier	Demi-bombée	Beige	Lisse	Circulaire



**Figure 17**: Aspect macroscopique des isolats après 24h d'incubation à 30°C.

## 1.2. Caractéristiques microscopiques des isolats

La technique de coloration de Gram, permet de révéler l'affiliation positive ou négative des cellules bactériennes selon la structure de leur paroi, et de déterminer la morphologie des cellules, ainsi que leur mode d'association. L'observation des frottis colorés sous microscope optique (grossissement X1000) montre que les isolats présentent une forme bacille et de couleur rose (Gram négatif) (figure18).

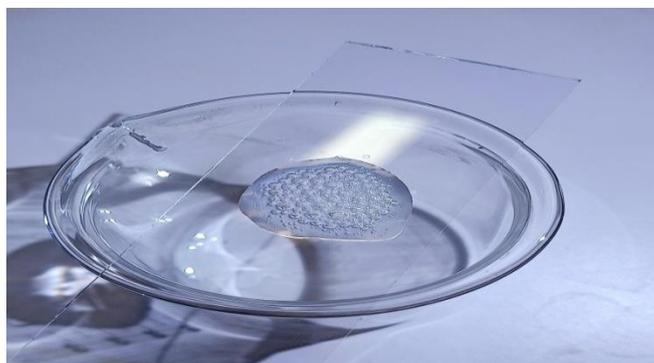


**Figure18** : Aspect microscopique des isolats après une coloration de Gram (Grossissement  $\times 1000$ ).

## 1.3. Etude des enzymes respiratoires

### 1.3.1. Test catalase

Les résultats montrent que toutes les souches testées possèdent une enzyme catalase positif (figure 19). D'après Larpent et Larpent-Gourgaud, (1985) l'enzyme catalase accélère la décomposition de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau ( $H_2O$ ) et en oxygène ( $O_2$ ).

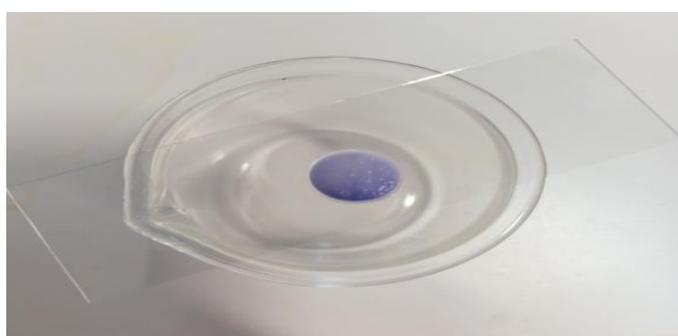


**Figure 19** : Test de catalase positive

### 1.3.2. Test oxydase

Le test de l'oxydase est basé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire. En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, l'enzyme oxyde le réactif phénylène- diamine, pour former un composé coloré en violet (singleton, 1999).

Les résultats obtenus montrent que les isolats sont oxydase positif, une réaction positive est indiquée par un virage de la couleur de disques vers le bleu foncé à violet dans quelques secondes (figure 20), donc les isolats sélectionnées possèdent l'enzyme respiratoire (cytochrome oxydase).



**Figure 20 :** Test d'oxydase positif

## 2. Identification des isolats par galeries API 20NE

La caractérisation biochimique des isolats a été testée en utilisant les galeries API (API 20NE Bio Mérieux France) (figure 21), et l'identification a été faite grâce à un logiciel d'identification (APIWEB™), les isolats testés ont été identifiés comme décrit dans le tableau 02.



**Figure 21:** Galerie API 20NE ensemencée par la souche B2  
Après 24h d'incubation.

Tableau 02 : Caractères des souches identifiées

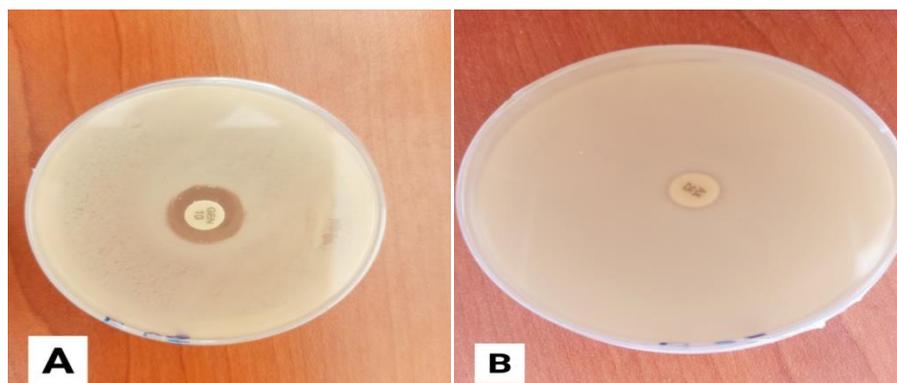
	Souche	Gram	Catalase	Oxydase
S1	<i>Pseudomonas luteola</i>	-	+	+
S2	<i>Pseudomonas Stutzeri</i>	-	+	+
S6	<i>Pseudomonas fluorescent</i>	-	+	+
S7	<i>Pseudomonas luteola</i>	-	+	+
B1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-	+	+
B2	<i>Pseudomonas fluorescent</i>	-	+	+
B4	<i>Pseudomonas luteola</i>	-	+	+

### 3. Antibiogramme

Lors de la réalisation d'un antibiogramme, l'utilisation d'antibiotiques (marqueurs de résistance) permet en partie de mettre en évidence un mécanisme génétique et biochimique de résistance (Benouda et Tagajdid, 2008). L'interprétation de l'antibiogramme, sur la base de ces mécanismes, permet de déduire la capacité de la résistance ou de la sensibilité de souches testées vis-à-vis des substances antimicrobiennes présentes dans le sol (Amer, 2008). Les souches de *Pseudomonas* se testées sont révélées résistantes à tous les antibiotiques testés (Tétracycline, Ciprofloxacine, Amoxicilline) (figure 22) sauf à la Gentamicine (tableau 03).

Les résultats obtenus ne sont pas en accord avec les études de Naghmouchi *et al.*, (2012) et Chaibdraa *et al.*, (2008), où ils ont prouvés la sensibilité de genre *Pseudomonas* vis-à-vis Tétracycline et Ciprofloxacine. D'un autre coté, la résistance des souches étudiées vis-à-vis l'amoxicilline a été prouvée par Yan Zhou *et al.*, (2015), surtout pour la souche *Pseudomonas fluorescens*. La sensibilité des souches de *P* aux antibiotiques y compris la gentamicine a été également testée *in vitro* par Foyssal *et al.*, (2011).

Selon Segonds *et al.*, (2001), la résistance est principalement due à la faible perméabilité de membranes des souches testées ce qui réduira la pénétration des molécules. Les bactéries peuvent également acquérir une résistance aux antibiotiques après modification génétique par mutation ou acquisition de matériel génétique étranger, qui n'est présent que dans certaines souches (Faure, 2009).



**Figure 22** : Résultat d'antibiogramme

**A**: Bactérie sensible; **B**: Bactérie résistance

**Tableau 03**: Résistance de souches aux antibiotiques

Code	Souche	Tetracycline	Ciprofloxacine	Gentamicine	Amoxicilline
S1	<i>Pseudomonas luteola</i>	R	R	S	R
S2	<i>Pseudomonas Stutzeri</i>	R	R	S	R
S6	<i>Pseudomonas fluorescent</i>	R	R	S	R
S7	<i>Pseudomonas luteola</i>	R	R	S	R
B1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	R	R	S	R
B2	<i>Pseudomonas fluorescent</i>	R	R	S	R
B4	<i>Pseudomonas luteola</i>	R	R	S	R

#### 4. Analyse physico-chimique de sol

L'ensemble des paramètres physico-chimiques a été inclus dans le Tableau 04. Ces analyses ont été réalisées au laboratoire agronomique FERTIAL (Annaba) ; Les analyses physico-chimiques permettant d'estimer la fertilité naturelle de sol étudiée (Soltner, 2005).

Les résultats montrent que le sol c'est un sol limono-argileux sablonneux d'après le Triangle texturale (annexe 10). Le sol testé est pauvre en azote, et de concentration très faible en phosphore. C'est un sol non salé, à un PH alcalin (8,02), l'absence totale de matière montre que c'est un sol non fertile (annexe 11).

**Tableau 04:** Résultats d'analyses d'échantillon du sol (Tissemsilt)

Granulométrie (%)	P (ppm)	N (%)	Ca meq/100gr	MO (%)	Calcaire (%)	CE Ms/cm	Mg meq/100gr	PH	Rapport (C/N)
Sable 52%									
Limon 20%	4.4	0.07	31,7	/	/	0.26	3.5	8.02	/
Argile 28%									

**P** : Phosphate **N** : Azote totale **Ca** : Calcium échangeable **MO** : Matière Organique **Mg** : Magnésium  
**CE** : Conductivité Electrique

### 5. Effet de l'inoculation de *Pseudomonas* sur le petit pois (*Pisum sativum*)

Plusieurs études ont montré que le genre *Pseudomonas sp.* qualifiées de groupe de bactéries rhizobactériques (PGPR Plant Growth Promoting Rhizobactéria), ont réussi à s'adapter et à se combiner facilement avec une grande variété de plantes et à augmenter considérablement leurs rendements. L'effet bénéfique de ces microorganismes telluriques résulte de la phytostimulation et du biocontrôle de divers phytopathogènes ; et sont également impliqués dans l'induction d'une résistance systémique chez plusieurs espèces végétales vis-à-vis de multiples agents pathogènes (Kloepper et Schroth, 1978 ; Van Loon *et al.*, 2002).

Un test d'inoculation de souches de *Pseudomonas* a été effectuée sous des conditions semi-contrôlées nous permettrait d'évaluer l'effet d'un apport d'inoculum de chaque souche testée sur la croissance de petit pois (*Pisum sativum* L.) (figure23). Ce test nous a permis de sélectionner l'inoculum le plus performant, et de prouver l'appartenance des isolats obtenus groupe de rhizobactéries stimulatrices de la croissance de plantes.



**Figure23:** Test d'inoculation des plantes de petit pois (*Pisum sativum* L.) par les souches testées

### 5.1. Estimation de pouvoir symbiotique

Le pouvoir symbiotique est estimé par le nombre de nodules former au niveau des racines de plantes, lors de cette étude, aucun nodule n'a été enregistré sur les racines de petit pois (*Pisum sativum* L.), et par conséquent l'inoculation des souches de *Pseudomonas* testées n'a pas renforcé l'établissement de la relation symbiotique attendue.

Les facteurs défavorables du milieu semblent influencer clairement les processus de fixation de l'azote, tels que les propriétés physiques et chimiques du sol (sol limono-argileux, pH alcalin, carence en phosphore,...) (annexe 11) (O'hara *et al.*, 1988).

L'échec de la nodulation peut être également dû au sol non fertile, marqué par l'absence totale de la matière organique (annexe 11), et par la suite la faible activité microbienne (Robert, 1996), et faible population rhizobienne native principalement infective et efficiente.

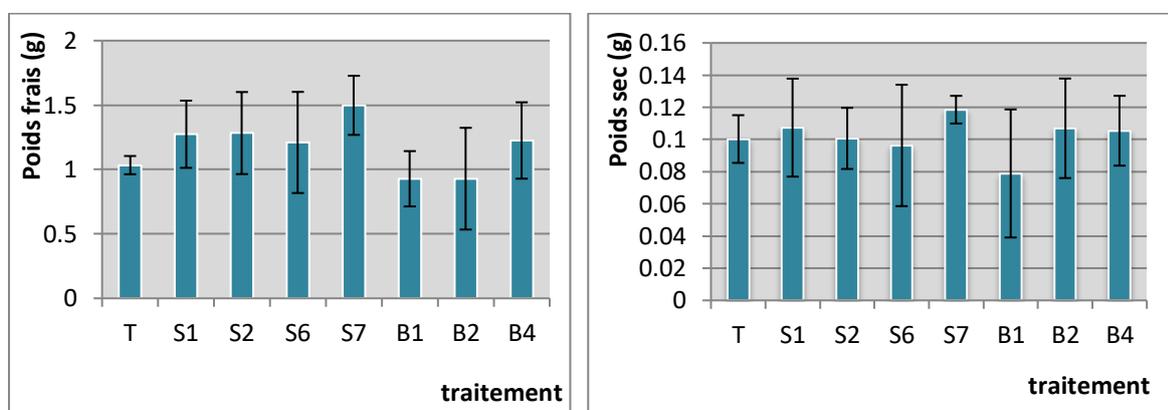
### 5.2. Effet de l'inoculation sur le poids frais et sec des plantes

Les résultats obtenus révèlent que 05/07 souches (*Pseudomonas luteola* S1, *Pseudomonas Stutzeri* S2, *Pseudomonas fluorescent* S6, *Pseudomonas luteola* S7, *Pseudomonas luteola* B4) ont la capacité d'améliorer nettement le pois frais de petit pois (*Pisum sativum* L.) par rapport aux témoins non inoculés. Statistiquement cette réponse montre que l'effet de souches sur le poids frais des plantes est significatif ( $\leq 0.05$ ) (annexe 12), ces résultats s'expliquent par le fait que les souches motionnées sont capables de produire certaines phytohormones tel que la Gibbérelline responsable de l'élongation des tiges et l'expansion des feuilles, augmentent ainsi la taille des fruits, et le nombre de bourgeons (Matsuoka *et al.*, 2003).

Selon la figure 23, les souches (*Pseudomonas luteola* S1, *Pseudomonas luteola* S7, *Pseudomonas fluorescent* B2, *Pseudomonas luteola* B4) ont la capacité d'améliorer le pois sec des plantes de petit pois (*Pisum sativum* L.) par rapport aux témoins non inoculés, et l'effet le plus remarquable est celui d'une amélioration de la croissance de plantes inoculées par la souche *Pseudomonas luteola* S7 (figure 24), mais statistiquement cette réponse n'a aucun effet significatif ( $> 0.05$ ) (annexe 13) ; ce qui n'est pas en accord avec les résultats obtenus par Morgado *et al.*, (2015), qui ont prouvé la performance de *Pseudomonas luteola* via l'observation d'une amélioration de la croissance de la canne à sucre (*Terra latinoamericana*).

D'autre coté, l'inoculation avec (*Pseudomonas Stutzeri* S2, *Pseudomonas fluorescent* S6, *Sphingomonas paucimobilis* B1, *Pseudomonas fluorescent* B2) n'a pas améliorée le poids sec de plantes de pois et leur croissance était presque égale et inférieure à celle enregistrée dans les témoins non inoculés (figure 24). Ces résultats ne concordent pas avec les résultats obtenus par Ouserir *et al.*, (2018), qui ont prouvé que *Pseudomonas sp.* en particulier *P fluorescent* montre des effets bénéfiques sur la fève (*Vicia faba*).

Les résultats obtenus nous ont permis de suggérer que les souches inoculées ne sont pas très compétitives. D'après Robert (1996), les facteurs édaphiques peuvent être également à l'origine de tel résultat, tel que l'absence de la matière organique dans le sol (annexe 11) qui est un indice de sa fertilité et qui favorise l'activité microbienne



**Figure 24** : Effet de souches sur le poids frais et sec de petit pois (*Pisum sativum* L.)

**T**: Témoins, **S1**: *P luteola*, **S2**: *P Stutzeri*, **S6**: *P fluorescent*, **S7**: *P luteola*, **B1**: *S paucimobilis*, **B2**: *P fluorescent*, **B4**: *P luteola*

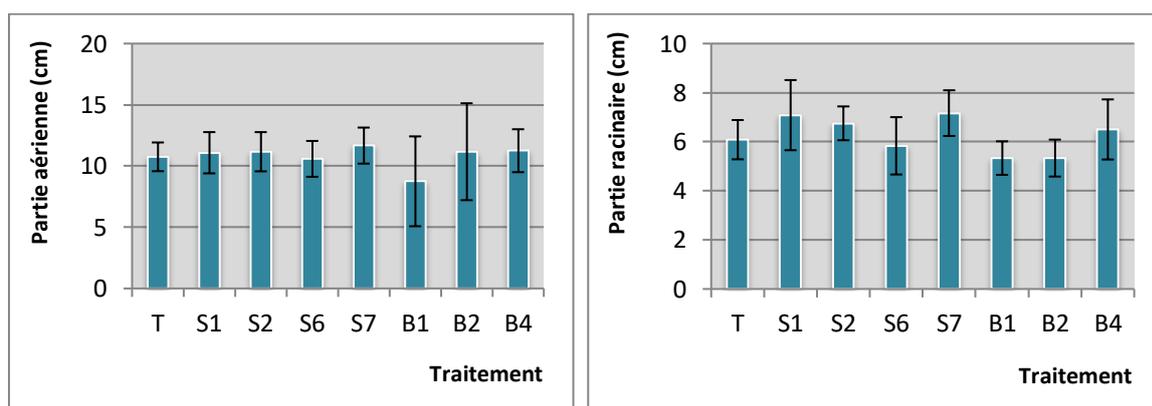
### 5.3. Effet sur la longueur de la partie aérienne et racinaire

L'inoculation de petit pois (*Pisum sativum* L.) avec les souches sélectionnées n'a pas stimulé le développement de la partie aérienne des plantes par rapport aux témoins non inoculés (figure 25), et l'étude statistique montre que l'effet de souche n'a aucun effet significatif ( $P > 0.05$ ) (annexe 14). Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux de Agbodjato *et al.*, (2018), qui ont montré que l'inoculation du maïs (*Zea mays* L.) par *Pseudomonas fluorescents* présente des meilleurs résultats sur la hauteur, le diamètre et la surface foliaire avec des augmentations respectives de 27,29 % par rapport aux témoins.

Les souches (*Pseudomonas luteola* S1, *Pseudomonas Stutzeri* S2, *Pseudomonas luteola* S7, *Pseudomonas luteola* B4) ont la capacité de stimuler nettement la croissance de la partie racinaire des plantes par rapport aux témoins non inoculés, et l'effet le plus remarquable est celui d'une amélioration nette de la longueur racinaire des plantes inoculées par la souche (*Pseudomonas luteola* S7) (figure 25), et l'étude statistique confirme ce résultat, où l'effet de souches sur la longueur racinaire est hautement significatif ( $P < 0,01$ ) (annexe 15).

Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les souches testées sont capables de produire certains phytoestimulants permettront de stimuler le développement racinaires tel que l'Acide Indole Acétique (AIA) (Taghavi *et al.*, 2009). Patten et Glick, (2002) ont également rapporté le rôle de l'AIA produit par *Pseudomonas* sur le développement de système racinaire des plantes.

La longueur de la partie aérienne et racinaire des plants inoculés par *Sphingomonas paucimobilis* B1 semble assez faible, ce résultat a été également constaté lors de la mesure de poids frais et sec. Par contre la performance de la souche *Sphingomonas paucimobilis* a été prouvée par Takeuch *et al.*, (1995), qui ont constaté que cette souche pourrait favoriser l'absorption des ions minéraux par les plantes. Tsavkelova *et al.*, (2007) se sont étendus au-delà des souches individuelles comme inoculant et ont signalé une augmentation de la germination des graines d'orchidées (*Dendrobium moschatum*) inoculées avec *Sphingomonas spp.*



**Figure 25:** Effet des souches sur la longueur de la partie aérienne et racinaire de petit pois (*Pisum sativum* L.)

**T:** Témoin, **S1:** *P luteola*, **S2:** *P Stutzeri*, **S6:** *P fluorescent*, **S7:** *P luteola*, **B1:** *S paucimobilis*, **B2:** *P fluorescent*, **B4:** *P luteola*

# Conclusion

## Conclusion

---

Les engrais synthétiques et les produits phytosanitaires chimiques sont devenus plus nocifs, car ils sont reconnus comme des polluants environnementaux majeurs, entraînant une détérioration des propriétés biologiques du sol. La valorisation des ressources biologiques dans la gestion des systèmes agricoles, est parmi les alternatives proposées pour limiter l'utilisation des intrants chimiques.

La performance des Bio-intrants tels que les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobactéries) a été déjà prouvée par plusieurs chercheurs. Ces microorganismes telluriques peuvent améliorer la croissance des plantes *via* une large *gamme de mécanismes*.

Un essai comparatif a été réalisé sous des conditions semi contrôlées sur le petit pois (*Pisum sativum L.*) inoculé par des souches de *Pseudomonas* sp. Sept souches ont été sélectionnées, leur caractérisation phénotypique, et biochimique a été vérifiée. Un test d'antibiogramme a été effectué, et les résultats montrent que les souches sélectionnées sont révélées résistantes à tous les antibiotiques testés (Tétracycline, Ciprofloxacine, Amoxicilline) sauf à la Gentamicine.

Aucun nodule n'a été enregistré sur les racines de petit pois (*Pisum sativum L.*), ce qui montre que l'inoculation par les souches testées n'a aucun effet sur la valorisation de potentiel symbiotique. L'échec de la nodulation peut être du également à l'absence ou l'inefficacité de bactéries fixatrices d'azote dans le sol, ou bien entraver par des facteurs pédologiques.

05/07 souches ont la capacité d'améliorer nettement le poids frais de petit pois (*Pisum sativum L.*) par rapport aux témoins non inoculés. L'inoculation a également stimulé la croissance de la partie racinaire des plantes, et l'effet le plus remarquable a été enregistré par la souche (*Pseudomonas luteola S7*), l'étude statistique confirme ce résultat, où l'effet de souches est hautement significatif ( $p < 0,01$ ).

Il serait souhaitable approfondir et élargir la portée de ce domaine par :

- Etude des activités des PGPR (solubilisation du phosphate, production de phytohormones, sidérophores ... etc).
- Renforcement de potentiel symbiotique en utilisant des PGPR plus performants.
- L'élaboration des PGPR pour des applications commerciales en convertissant ces complexes bactériens en un produit de remplacement pour les engrais et les produits chimiques.

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

---

- **Aerts R; Chapin FS .1999.** The Mineral Nutrition of Wild Plants Revisited: A Re-evaluation of Processes and Patterns. *Advances in Ecological Research*. Elsevier, pp 1–67
- **Agbodjato A N; Noumavo A P; Amogou O; Adoko M; Dagbenonbakin G; Falcon Rodriguez A ; Baba-Moussa L . 2018.** Impact de l'utilisation des Rhizobactéries Promotrices de la Croissance des Plantes (PGPR) en combinaison avec le chitosane sur la croissance et le rendement du maïs (*Zea mays* L.) sur sol ferrallitique au Sud-Bénin. *Microbiological Research*, 4(0), pp.395-407
- **Agrios G N. 1988.** “*Plant Pathology*”, 3rd. ed. Academic Press, Inc.: New York, 803p.
- **Agueniou F; Nabti E H E; Zeggagh H . 2017.** Effet de la physicochimie des sols sur la diversité phénotypique et fonctionnelle des bactéries telluriques et l'interaction Bactérie-Blé dur.
- **Ahemad M; Kibret M . 2014.** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science* 26: 1–20
- **Akibode C S; Maredia M K. 2012.** Global and regional trends in production, trade and consumption of food legume crops (No. 1099-2016-89132).
- **Allaire M. 2005.** Diversité fonctionnelle des *Pseudomonas* producteurs d'antibiotiques dans les rhizosphères de conifères en pépinières et en milieu naturel (Doctoral dissertation, Université Laval).
- **Alquati C ; De Gioia L ; Santarossa G ; Alberghina L ; Fantucci P ; Lotti M. 2002.** The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi*. Heterologous expression, biochemical characterization and molecular modeling. *Eur. J. Biochem.* 269: 3321-3328.
- **Amer M M. 2008.** Monitoring variation among faba bean *Rhizobium* isolates. Growth curve, exo-polysaccharides and antibiotic resistance. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences.* 4: 462-470.
- **Anand K; Kumari B; Mallick MA. 2016.** Phosphate solubilizing microbes: an effective and alternative approach as bio-fertilizers. *Int.J. Pharm. Sci.* 8: 37–40
- **Argueso C T; Ferreira F J; Epple P; To J P. C; Hutchison C. E; Schaller GE; Dangl J L; Kieber J J. 2012.** Two-Component Elements Mediate Interactions

## Références bibliographiques

---

- between Cytokinin and Salicylic Acid in Plant Immunity .PLoS Genetics, 8(1), e1002448. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002448>
- **Arkhipova T N; Veselov S U; Melentiev A I; Martynenko E V; Kudoyarova G R. 2005.** Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokine's and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil*, 272(1-2), 201-209. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-5047-x>
  - **Arora NK; Tewari S; Singh R. 2013.** Multifaceted Plant-Associated Microbes and Their Mechanisms Diminish the Concept of Direct and Indirect PGPRs. In: Arora NK (Ed). *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*. Springer, 411-449.
  - **Ashraf M. A. 2020.** Cytokinin Perception Also Starts at the Plasma Membrane. *Molecular Plant*, 13(11), 1534. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.09.021>
  - **Askeland RA; Morrison SM; 1983.** Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aieruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology*.
  - **Auger E.2007.**le petit pois : Dix façons de le préparer. vol.1. pp.10.
  - **Bakker AW; Schippers B. 1987.**Microbialcyanides production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas spp.* mediated plant growth stimulation .*Soil Biology and Biochemistry*.
  - **BAKKER P A; Van Peer R O N; SCHIPPERS B. 1991.** Suppression of soil-borne plant pathogens by *fluorescent pseudomonas*: mechanisms and prospects. In *Developments in Agricultural and Managed Forest Ecology* .Vol. 23, pp. 217-230. Elsevier.
  - **Beauchamp CJ. 1993.** Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique Vol(74), N°1.
  - **BENOUDA A ; TAGAJDID M.2008.** AntibioGramme: choix, interprétation et limites. *Les technologies de laboratoire*, 3(10).
  - **Bewley J D. 1997.** Seed germination and dormancy. *The plant cell*, 9(7), pp.1055.
  - **Binenbaum J; Weinstain R; Shani, E. 2018.** Gibberellin localization and transport in plants. *Trends Plant Sci*. 23: 410–421.
  - **Bottini R; Cassin F; Piccoli P. 2004.** Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology*.65 (5). <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1696-1>.

## Références bibliographiques

---

- **Boukhalfa H; Crumbliss AL. 2002.** Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals* 15: 325–339
- **Bradford KJ. 1995.** Water relations in seed germination. In: Kigel J, Galili G, Editors, *Seed Development and Germination*. New York: Marcel Dekker. p. 351-395.
- **Brink M ; Belay G.2006.** Ressources végétales de l’Afrique tropicales 1.Céréales et légumes secs.
- **Burger T G; Zhang Y. 2019.** Recent progress in the utilization of pea protein as an emulsifier for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 86, pp. 25-33.
- **Chaibdraa A; Medjellekh M S; Saouli A; Bentakouk M C. 2008.** Le *Pseudomonas*: expérience du Centre des Brûles D’Annaba et Revue de la Littérature. *Annals of Burns and Fire Disasters*, 21(4), pp.210
- **Choi J; Huh S U; Kojima M; Sakakibara H; Paek K H; Hwang I. 2010.** The Cytokinin-Activated Transcription Factor ARR2 Promotes Plant Immunity via TGA3/NPR Dependent Salicylic Acid Signaling in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 19(2), pp 284-295. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.07.011>
- **Cordovez V; Carrion VJ; Etalo D W; Mumm R; Zhu H; van Wezel G P; Raaijmakers JM .2015.** Diversity and functions of volatile organic compounds produced by *Streptomyces* from a disease-suppressive soil. *Front Microbiol* 6: 1081
- **Cousin R.1992.**In: Plancquaert P., Proc. Of the First European Conference on Grain Legumes, France, Assoc. EUR. Protéagineux, Paris, 53
- **De Souza J T ; Mazzola M ; Raaijmakers JM ; 2003.** Conservation of the response regulator gene *gacA* in *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology* 5
- **Defago G; Haas D.1990.** *Pseudomonas* as antagonists of soil borne plant pathogens: mode of action and genetic analysis. *Soil Biochemistry*.
- **Dénarié J; Debelle F; Promé JC. 1996.** Rhizobium lipo-chito-oligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65, p.503–535.
- **Dey R; Pal K; Bhatt D; Chauhan M. 2004.** Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *MicrobioRes.* p 371-394
- **Diedhiou I; Diedhiou A G; Diouf D. 2022.** La symbiose fixatrice d’azote: types et régulateurs transcriptionnels de la nodulation. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 16(2), pp.695-712.

## Références bibliographiques

---

- **Djekoun A ; Riah N ; Laguerre G ; De Lajudie P. 2017.** Diversité et structure génétique des populations de *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae* isolées du pois (*Pisum sativum*) et de la lentille (*Lens culinaris*) cultivés dans deux zones éco-climatiques subhumide et semi-aride de l'est Algérien. P.119
- **Doorenbos j ; Kassam AH ; Bentverisen C L M ; Branscheid V ; Plusjé J M G A ; Smith M ; Uittengogaard G O ; Van der val H K. 1987.** Exigence de blé dur. Bulletin FAO d'irrigation et de drainage (33). Rome: p 202.
- **Downie J A. 2010.** The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS microbiology reviews*, 34(2), p. 150-170.
- **Doyle J J; Luckow M A. 2003.** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant physiology*, 131(3), p.900-910.
- **Duchaufou P h. 1997.** Abrégé de pédologie sol. Végétation envirement.Masson, Paris, pp.291
- **El Idrissi M M; Lamin H ; Bouhnik O; Lamrabet M; Alami S;Jabrone Y ; Bennis M ;Bedmar J ;Abdelmoumen H. 2020.** Characterization of *Pisum sativum* and *Vicia faba* microsymbionts in Morocco and definition of symbiovar *viciae* in *Rhizobium acidisoli*. *Systematic and applied microbiology*, 43(3), p.126084
- **Endres G; Forster R; Kandel H; Pasche J;Wunsch M; Knodel J; Hellevang K; 2016.** Field pea production. North Dakota State University.p.11
- **FAO.2019.** Normes applicables aux banques de gènes : pour les ressources génétiques, pour l'alimentation et l'agriculture. P.182. <http://www.fao.org/3/a-i3704f.pdf>
- **Faure S. 2009.** Transfert d'un gène de résistance aux  $\beta$ -lactamines blaCTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : impact d'une antibiothérapie. Thèse de doctorat. 32p
- **Ferret C.2012.** Rôle des *Pseudomonas fluorescents* dans la biodisponibilité des métaux contaminant les minéraux du sol : application à la phytoremédiation. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat. Université de Strasbourg Biotechnologies et Signalisation Cellulaire. Strasbourg, France.
- **Foyzal M J; Rahman M M; Alam M. 2011.** Antibiotic sensitivity and in vitro antimicrobial activity of plant extracts to *pseudomonas fluorescents* isolates collected from diseased fish. *International Journal of Natural Sciences*, 1(4), 82-88

## Références bibliographiques

---

- **Fravel D R.1988.** Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annu Rev Phytopathol.* 26: p.75-91.
- **Garcia Lucas J A; Schloter M; Durkaya T; Hartmann A; Gutierrez Maero F J.2003.** Colonization of pepper roots by a plant growth promoting *pseudomonas fluorescens* strain. *Biol Fertil Soils* 37(6):381-385.
- **Gibson F; Magrath D J; 1969.** -Biochim. Biophys. Acta 192, 175–18.
- **Giraud E. 2007.** Symbiose rhizobium/légumineuse: un nouveau sésame. *médecine/sciences*, 23(6-7), 663-666.
- **Goudaa S; Kerryb R G; Dasc G; Paramithiotisd S; Shine H S; Patra K J. 2018.** Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol. Res.* 206: 131–140
- **Govind G; Shailendra S P; Narendra K A, Sunil K S; Vinod S. 2015.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Microb Biochem Technol*, 7:2
- **Gray N S; Brown A S; MacCulloch M J; Smith J; Snowden R J. 2005.** An implicit test of the associations between children and sex in pedophiles. *Journal of Abnormal Psychology*, 114(2), 304.
- **Griffiths G; Trueman L; Crowther T; Thomas B; Smith B. 2002.** Onions-a global benefit to health. *Phytotherapy research*, 16(7), 603-615.
- **Groenhagen U; Baumgartner R; Bailly A; Gardiner A; Eberl L; Schulz S; Weisskopf L. 2013.** Production of bioactive volatiles by different *Burkholderia ambifaria* strains. *J Chem Ecol* 39: 892–906
- **Grubben G J. H. 2004.** *Legumes* .PROTA.Vol (2). P.473-474
- **Grubben G J. H; Denton O. A. 2004.** Plant resources of tropical Africa 2. Vegetables. *Plant resources of tropical Africa 2. Vegetables*.
- **Gubry-Rangin C; Garcia M; Béna G. 2010.** Partner choice in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium* symbiosis. *Proc. Biol. Sci.* 277, 1947–1951.
- **Guiraud J P.2003.** Microbiologie Alimentaire. *Tec &Doc, Dunod.* Paris. P.90-292.
- **Gupta M; Kiran S; Gulati A; Singh B; Tewari R. 2012.** Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. *Microbiol. Res.* 167.358–363.
- **Haas D; Defago G. 2005.** Biological control of soil-borne pathogens by *fluorescent Pseudomonas*. *Nat Rev Microbiol.* 3: 307-19.

## Références bibliographiques

---

- **Handelsman J; Stabb E.V. 1996.** Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* 8: 1855-1869.
- **Harmankaya M; Özcan M M; Karadas S; Ceyhan E.2010.** Protein and mineral contents of pea (*Pisum sativum* L.) genotypes grown in Central Anatolian region of Turkey. *South Western Journal of Horticulture, Biology and environment* 1 (2): 159-165.
- **Hayat R; Ali S; Amara U; Khalid R; Ahmed I. 2010.** Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol.*, 60, 579-598
- **Hopkins W G. 2003.** *Physiologie végétale.* De Boeck Supérieur. irontransport. *BioMetals* 15: 325–339
- **Janzen J P; Brester G W; Smith V H; 2014.** Dry pea: trends in production, trend and price. *Agricultural marketing policy center* n° 57: 7p.
- **Jehl F ; Chabaud A ; Grillon A. 2015.** L’antibiogramme: diamètres ou CMI? *Journal des Anti-infectieux*, 17(4), 125-139.
- **Joo G J; Kang S; Hamayun M ;Kim C; Shin D; Lee, I.J. 2009.** *Burkholderia* sp. KCTC 11096BP as a newly isolated gibberellins producing bacterium *Microbiol.*47:167
- **Jurtshuk P; McQuitty DN.1976.** Use of a quantitative oxidase test for characterizing oxidative metabolism in bacteria. *Appl Environ Microbiol*; 31(5):668–679.
- **Kanchiswamy C N; Malnoy M; Maffei M E.2015** Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Front Plant Sci* 6: 151
- **Kang S; Khan A; Waqas M; You Y; Hamayun M; Joo G. 2015.** Gibberellin-producing *Serratia nematodiphila* PEJ1011 ameliorates low temperature stress in *Capsicum annuum* L. *Eur. J. Soil Biol.* 68: 85–93.
- **Katrijn M; Piet S; Peter A V. 2007.** Monitoring and modelling pesticide fate in surface water at the catchment scale. *Ecological Modelling.* 209, 53-64.
- **Khan A A; Jilani G; Akhtar M S; Naqvi S M S; Rasheed M. 2009.** Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J agric biol sci*, 1(1), 48-58
- **Kim Juries D C.1994.** Nitrogénase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry* 33: 389–397.
- **King E O ; Ward M K ; Raney D E ; 1954,** Deux médias simples pour la démonstration de pyocyanine et de fluorescéine. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307.

## Références bibliographiques

---

- **Kirdi B ; Zermane N. 2010.** Rôle des PGPR dans la stimulation de la croissance végétale et la lutte contre les phanérogames parasites : *Orobanche crenata* Forsk. et *Cuscuta campestris* Yuncker / “Role of PGPR in plant growth promotion and control of the parasitic weeds: *Orobanche crenata* Forsk. and *Cuscuta campestris* Yuncker”.
- **Kloepper J W; Schroth M N.1978.** «Plant growth– promoting rhizobacteria on radishes», In: Proc int Conf Plant Pathol Bact Angers, pp. 379 - 382.
- **Kloepper J W; Ryn C; Zhang S. 2004.** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus sp.* Phytopathol. 94: 1259-1266
- **Kovacs L G; Ballati P A; Kroshman H B; Pueppke S G. 1995.** Transcriptional organization and expression of nol XWBTUV.A Locus that regulate cultivar-specific nodulation soybean by *Rhizobium fredii* USDA 257. Molecular Microbiology, Vol 17. pp 923-933.
- **Kuffner M; Puschenreiter M; Wieshammer G; Gorfer M; Sessitsch A.2008.** Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. Plant Soil 304: 35- 44.
- **Larpent J P ; Larpent-Gourgaud M. 1985.** Manuel pratique de microbiologie. Ed Hatmann, France, pp. 230.
- **Laussou A J.2008.** Effet de différentes pratique de taille sur amélioration de performances agronomiques du cotonnier *Gossypiumhirsutum* L. thèse ingénieur agronome, Parakou, Bénin, p.20.
- **Lee B; Farag M A ;Park H B ; Kloepper J W; Lee S H; Ryu C M . 2012.** Induced resistance by a long-chain bacterial volatile: elicitation of plant systemic defense by a C13 volatile produced by *Paenibacillus polymyxa*. PLoS ONE 7: e48744
- **Lewis G P; Schrire B; Mackinder B; Lock M.2005.** *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens Kew. P.577
- **Maheshwari D; Dheeman S; Agarwal M. 2015.** “Phytohormone producing PGPR for sustainable agriculture,” in Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem, edD. Maheshwari (Cham: Springer): p.159–182.
- **Manaia C M; Moore E R. 2002.** *Pseudomonas thermotolerans sp.* Nov., a thermo-tolerant species of the genus *Pseudomonas* sensu stricto. Int. J. Syst. Evol. Microbial. 52, 2203–2209
- **Margni M ; Rossier D ; Crettaz P ; Jolliet O. 2002.** Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agriculture, ecosystems & environment*, 93(1-3), pp. 379-392

## Références bibliographiques

---

- **María Lis Yanes; Natalia Bajsa. 2016.** *Fluorescent Pseudomonas: A Natural Resource from Soil to Enhance Crop Growth and Health.* Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability .pp 323-349.
- **Matsuoka M ; Kaneko M ; Itoh H ; Inukai Y ; Sakamoto T ; Ueguchi-Tanaka M ; Ashikari M. 2003.** Où se produisent la biosynthèse de la gibbérelline et la signalisation de la gibbérelline dans les plants de riz? Le journal des plantes. 35 : 104–115
- **Meyer J M. 1977.** Pigment fluorescent et métabolisme du fer chez *Pseudomonas fluorescens*. Thèse de Doctorat d'Etat, Strasbourg.
- **Moore E ; Tindall B ; Martins Dos Santos V ; Pieper D ; Ramos H ; Palleroni N. 2006** Nonmedical: *Pseudomonas*, In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, et E. Stackebrandt (ed.), Prokaryotes, Springer, USA. PP. 646-703.
- **Morgado González A; Espinosa Victoria D; Gómez-Merino F. 2015.** Efficiency of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in sugarcane. Terra Latinoam. 33: 321–330
- **Moustaine M; Elkahkahi R; Benbouazza A; Benkirane R; Achbani E. 2017.** Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth in tomato (*Solanumly copersicum* L.) and characterization for direct PGP abilities in Morocco. International Journal of Environment, Agriculture Biotechnology, 2: 238-708.
- **Munees A; Mulugeta K .2014** .Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective, Journal of King Saud University – Science, January Volume 26, and Issue 1.
- **Mylona P; Pawlowski K; Bisseling T; 1995.** Symbiotic nitrogen fixation. Plant Cell 17,869-885.
- **Naghmouchi K; Le Lay C; Baah J; Drider D. 2012.** Antibiotic and antimicrobial peptide combinations: synergistic inhibition of *Pseudomonas fluorescens* and antibiotic-resistant variants. *Research in microbiology*, 163(2), pp.101-108.
- **Naik P R; Raman G; Narayanan K B; Sakthivel N. 2008.** Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing *fluorescent pseudomonas* isolated from rhizospheric soil. BMC Microbiol. 20 (8), p. 230
- **Nyabyenda P. 2005.** Les plantes cultivées en régions tropicales d'altitude d'Afrique: Généralités, Légumineuses alimentaires, Plantes à tubercules et racines, Céréales. (Vol. 1). Presses agronomiques de Gembloux .p.63

## Références bibliographiques

---

- **O'hara G; Boonkerd N; Dil Worth M J. 1988.** Mineral constraints to nitrogen fixation plant and Soil. 108: 93-110.
- **Ossowicki A; Jafra S; Garbeva P. 2017.** The antimicrobial volatile power of the rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482. PLoS ONE 12: e0174362
- **Ouserir S; Chennaoui N; Benchabane M. 2018.** Bacterisation effects by *Pseudomonas fluorescens* and *Rhizobium fabae* on nodulation stimulation and growth of bean (*Vicia faba* L. var. *Histal*). *AgroBiologia*, 8(1), pp.775-785
- **Pachico D H. 2005.** Towards a conceptual model of optimal investment in the conservation of agricultural genetic resources. In: International conference on Agricultural Biotechnology: International trade and Domestic production. Rome, Italy. p19.
- **Palleroni N J. 1984.** Genus I. *Pseudomonas* Migula, 237AL (nom. cons. opin. 5, jud. comm. 1952, 237). In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, pp. 141–199. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins
- **Panhwar Q A; Jusop S; Naher U A; Othman R; Razi M I. 2013.** Application of Potential Phosphate-Solubilizing Bacteria and Organic Acids on Phosphate Solubilization from Phosphate Rock in Aerobic Rice. *Sci. World J.* p.1–10
- **Patten C L; Glick B R., 2002.** Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary phase sigma factor RpoS. *Can. J.Microbiol.* 48: 635-642.
- **Perret X; Staehelin C; Broughton WJ. 2000.** Molecular basis of symbiotic promiscuity molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol .Mol. Biol.Rev.* 64, p. 180–201.
- **Persello-Cartieaux F; Nussaume L; Robaglia C. 2003.**Tales from the underground: molecular plant–rhizobacteria interactions. *Plant, Cell & Environment*, 26, p.189-199.
- **Polese J M. 2006.** *La culture des haricots et des pois.* Editions Artemis. P.14-17
- **Ponce A G; Fritz R; Del V; Roura S I b.2003.** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss L Wu. *Technol.* Vol. 36: 679-684.
- **Prat p. 2007.** Expérimentation en biologie et physiologie végétales .p .265
- **PRESCOTT L-M; HARLEY J-P; KLEIN D-A. 2003.** *Microbiologie*, 2ème Edition française, Edition De Boeck.doin .65

## Références bibliographiques

---

- **Raaijmakers J M; Vlami M; De Souza J T. 2002;** Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 537-547.
- **Ram H; Hedau N K; Chaudhari G V; Kant L. 2021.** Peas with zero shelling edible pods: A review. *Scientia Horticulturae*.p.288
- **Raza W; Ling N; Yang L; Huang Q; Shen Q .2016.** Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9. *Sci Rep* 6: 24856
- **Ricci E; Schwinghamer T; Fan D; Smith D L; Gravel V. 2019.** Growth promotion of greenhouse tomatoes with *Pseudomonas sp.* and *Bacillus sp.* biofilms and planktonic cells. *Applied Soil Ecology*, 138, p.61-68.
- **Robert M. 1996.** Le sol interface dans l'environnement, ressource pour l'environnement. Dunod. Masson, Paris. pp. 240
- **Rossum D V; Muyotcha A;Verserveld V W; Stouthmer A H; Boogerd F C.1994.**Siderophore production by *Bradyrhizobium spp.* Stains nodulating groundnut.*Plant and soil* 163: 177-187
- **Ryu C M; Farag M A; Hu C H; Reddy M S; Kloepper J W; Paré P W. 2004.** Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 134: 1017-1026
- **Sachs J L; Russell J E; Lii Y E; Black K C; Lopez G; Patil A S. 2010.** Host control over infection and proliferation of a cheater symbiont. *J. Evol. Biol.* 23: 1919–1927.
- **Sahgal M; Johri B N .2006.** Taxonomy of rhizobia: current status. *Curr Sci* 90:486–487.
- **Sarikamis G; Yanmaz; Ermis S; Bakir M; Yüksel C.2010.** Genetic Characterization of pea (*Pisum sativum* L.). *Genetics and molecular research* 9(1): 591-600
- **Sayyed R Z; Patel P R; Reddy M S.2013.** Role of PGPR in the bioremediation of heavy metal ions and plant growth promotion of wheat and peanut grown in heavy metal contaminated soil. Chapter 7 :106-120.
- **Schneider A ; Huyghe C. 2015.** Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables .Editions Quae. P.512
- **Segonds C; Chabanon G.2001.** *Burkholderia cepacia*: dangers of a phytopathogen organism for patients with cystic fibrosis. *Ann Bio Clin.* 59 (3). pp. 69-259
- **Singleton P.1999.** Bactériologie. Edition Duonod 4ème édition Paris.pp. 415.

## Références bibliographiques

---

- **Soltner D. 2005.** Les bases de la production végétale. Tome I (Le sol et son amélioration). Sciences et techniques agricoles. pp. 472
- **Spaepen S; Vanderleyden J; Okon Y. 2009.** Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. In: van Loon LC (ed) Advances in botanical research, vol 51. Academic, Burlington, pp. 283-320
- **Spaink H P. 1995** The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: the ins and outs of symbiogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. 33, 345–368
- **Stanier R Y ; Palleroni N J ; Doudoroff M ; 1966.** The aerobic *Pseudomonas*: a taxonomic study. J. Gen. Microbiol. 43:159–271
- **Taghavi S ; Garafola C; Monchy S ; Newman L ; Hoffman A ; Weyens N ; Barac T; Vangronsveld J; van der; Lelie D. 2009.** Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 748-757
- **Takeuchi M; Sakane T ; Yanagi M; Yamasato K; Hamana K; Yokota A. 1995.** Taxonomic study of bacteria isolated from plants, proposal of *Sphingomonas rosasp.* nov. *Sphingomonas asaccharolytica.* nov. and *Sphingomonas mali sp.* nov. Int J Syst Bacteriol 45: 334– 341.
- **Taylor C D; Konhauser K O. 2011.** Iron in Earth Surface Systems: A Review. In H.D. Holland & K.K. Turekian (Eds.), Treatise on Geochemistry (2nd ed., Vol. 9, pp. 1-36). Elsevier.
- **Tsavkelova E A ; Cherdyntseva T A; Klimova S Y; Shestakov A I; Botina S G; Netrusov A I. 2007.** Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. Arch Microbiol 188: 655–664.
- **Usda. 2008.** Plants profile of *Pisum sativum* L. (garden pea). United States Department of Agriculture (USDA), Natural Resources Conservation Service (NRCS), Plants Database
- **Vacheron J ; Desbrosses G ; Bouffaud M L ; Touraine B ; Moëgne-Loccoz Y ; Muller D. 2013.** Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning, Front PlantSci. 4(356): 1-19.
- **Van Loon L C; Bakker P A H M; Pieterse C M J. 2002.** «Prospects and challenges for practical application of rhizobacteria mediated induced systemic resistance». In: Induced Resistance in Plants against Insects and Diseases (A. Schmitt and B. Mauch-Mani, eds), IOBC/wprs Bulletin vol 25, N°6, pp: 75-82.

## Références bibliographiques

---

- **Van Loon L C; Geraats B P J; Linthorst H J M. 2006.** Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.*, 11: 184-191.
- **Van Weeps S C; van der ENT S; Pieterse C M. 2008.** Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 11: 443-448.
- **Vessey K. 2003.** Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers. In: *Plant and soil*. Vol. 255: 571-586.
- **Vincent J M. 1970.** A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: *International Biological Programme Handbook n°. 15*. Blackwell Scientific Publications Ltd. Oxford. pp. 73-97.
- **Wani H C; Vinay K; Varsha S, Saroj K S .2016.** Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants, *The Crop Journal*, 4 (3), 162-176
- **Whipps J. 2001.** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot.* 52: 487- 511.
- **Win K T; Tanaka F; Okazaki K; Ohwaki Y. 2018.** The ACC deaminase expressing endophyte *Pseudomonas spp.* Enhances NaCl stress tolerance by reducing stress-related ethylene production, resulting in improved growth, photosynthetic performance, and ionic balance in tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 127:599-607
- **Yuan C; Mou C; Wu W; Guo Y B. 2011.** Effect of different fertilization treatments on indole-3-acetic acid producing bacteria in soil. *J Soils Sediments* 11: 322-329
- **Yumoto I; Yamazaki K; Hishinuma M; Nodasaka Y; Suemori A; Nakajima K; Inoue N; Kawasaki K. 2001.** *Pseudomonas alcaliphila sp. nov.*, a novel facultatively psychrophilic alkaliphile isolated from seawater. *J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51 : 349-355.
- **Yves B ;laurent H ;Xavier F ; Jean-pierre P ; Pierre T. 2006.** organismes génétiquement modifiés: aspects socio-économiques, alimentaires et environnementaux, p.63-65.
- **Zhou Y ; Xu Y. B ; Xu J X ; Zhang X H ; Xu S H ; Du Q P. 2015.** Combined toxic effects of heavy metals and antibiotics on a *Pseudomonas fluorescens* strain ZY2 isolated from swine wastewater. *International Journal of molecular sciences*, 16(2), pp. 2839-2850.

## Références bibliographiques

---

### Référence électronique

<https://media.istockphoto.com> site consulté le 30/04/2023.

<https://jardinage.ooreka.fr> site consulté le 28/04/2023.

<https://www.sciencephoto.com/>

[www.researchgate.net](http://www.researchgate.net) site consulté le 01/05/2023

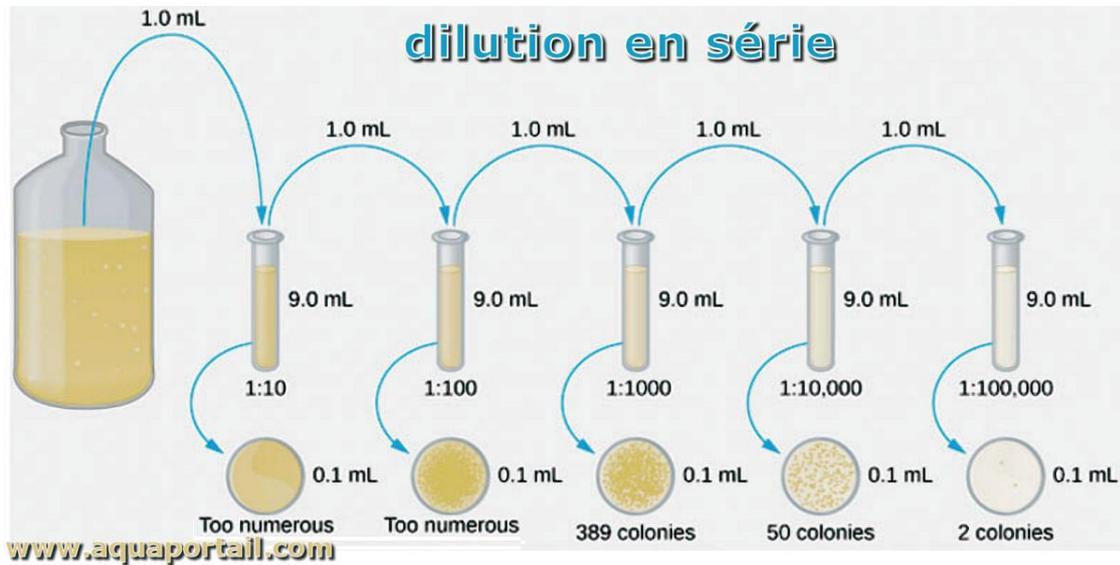
<http://madr.gov.dz> le site consulté 05/03/2023

# **ANNEXES**

# ANNEXES

## Annexe 01 :

### Technique de dilution



## Annexe 02

### King A

Peptone de caséine (Tryptone).....	20g
Sulfate de potassium .....	10g
Chlorure de magnésium .....	1.4g
Glycérol .....	10ml
Agar .....	20g
Eau distillé .....	1000ml
PH .....	7.2

## Annexe 03

### Violet de gentiane

Violet de gentiane.....	2g
Phénol .....	4g
Alcool .....	20ml
Eau distillée.....	200ml

## ANNEXES

---

### Annexe04

#### Lugol

Iode..... 1g  
Iodure de potassium (KI) ..... 2g  
Eau distillée..... 200ml

### Annexe 05

#### Fuchsine

Fuchsine basique ..... 2g  
Alcool 95..... 20ml  
Solution aqueuse ..... 200ml

### Annexe 06

#### Composition des standards de turbidité de Mc Farland

Solution ajoutée:

BaCl<sub>2</sub> (1,175%) ..... 0,05 ml

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>..... 9,95 ml

<b>Standard Mc Farland</b>	<b>0.5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Chlorure de baryum à 1%(ml)</b>	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
Acide sulfurique à 1%(ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
<b>Densité cellulaire approximative (1×10.8 UFC/ml)</b>	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
<b>Transmittance %</b>	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
<b>Absorbance</b>	0.08à 0.1	0.257	0.451	0.582	0.669

# ANNEXES

## Annexe 07

**Tableau de lecture de la galerie API 20NE**

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO <sub>3</sub>	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	incolore	rose-rouge
			réduction des Nitrates en azote	rose	incolore
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRyptOPhane)	JAMES / immédiat	
				incolore vert pâle / jaune	rose
GLU	D-glucose	1,92	fermentation (GLUcose)	bleu à vert	jaune
ADH	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	jaune	orange / rose / rouge
URE	urée	0,76	UREase	jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse (β-glucosidase) (ESCuline)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-β-D- galactopyranoside	0,22	β-galactosidase (Para-NitroPhényl-β-D- Galactopyranosidase)	incolore	jaune
[GLU]	D-glucose	1,56	assimilation (GLUcose)	transparence	trouble
[ARA]	L-arabinose	1,4	assimilation (ARABinose)	transparence	trouble
[MNE]	D-mannose	1,4	assimilation (ManNosE)	transparence	trouble
[MAN]	D-mannitol	1,36	assimilation (MANnitol)	transparence	trouble
[NAG]	N-acétyl-glucosamine	1,28	assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)	transparence	trouble
[MAL]	D-maltose	1,4	assimilation (MALtose)	transparence	trouble
[GNT]	potassium gluconate	1,84	assimilation (potassium GlucoNaTe)	transparence	trouble
[CAP]	acide caprique	0,78	assimilation (acide CAPrique)	transparence	trouble
[ADI]	acide adipique	1,12	assimilation (acide ADIrique)	transparence	trouble
[MLT]	acide malique	1,56	assimilation (MaLaTe)	transparence	trouble
[CIT]	trisodium citrate	2,28	assimilation (trisodium CITrate)	transparence	trouble
[PAC]	acide phénylacétique	0,8	assimilation (acide PhénylACétique)	transparence	trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

## Annexe 08

### Mueller-Hinton

Peptone de caséine (Tryptone) .....	17,5 g
Extrait de viande.....	2g
Amidon .....	1, 5g
Agar .....	18g
Eau distillé .....	1000 ml
PH .....	7,3

# ANNEXES

## Annexe 09

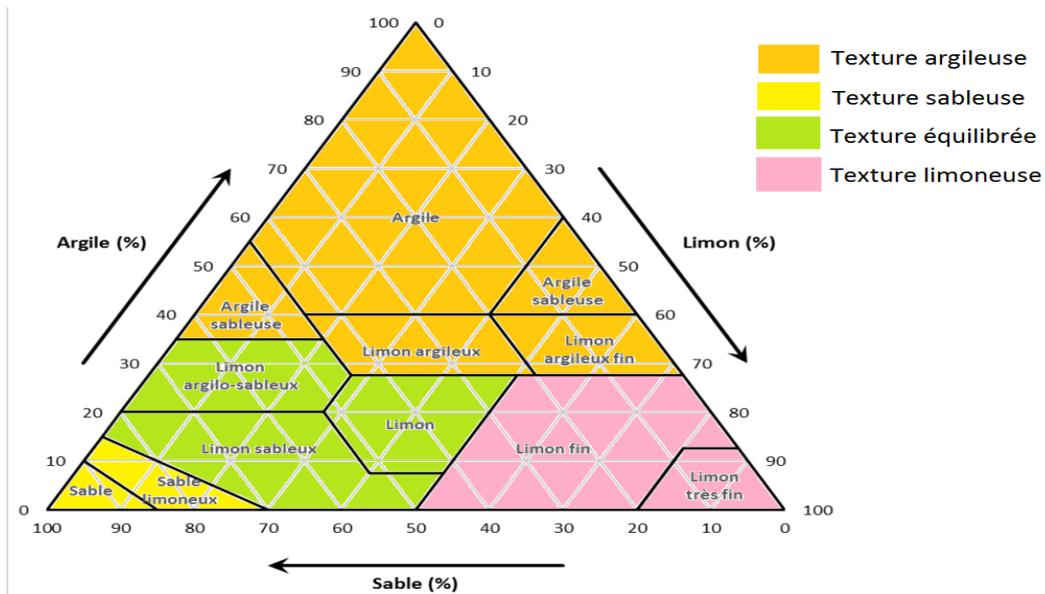
### Eau gélosé

Agar- agar ..... 1g

Eau distillée ..... 100ml

## Annexe 10

### Le triangle de texture (Duchaufour, 1997)



## Annexe 11

### Analyse physico chimiques du sol



# ANNEXES

## Annexe 12

### Effet de l'inoculation sur le poids frais

ANOVA					
poidsfrais					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,626	7	,232	2,769	,019
Within Groups	3,355	40	,084		
Total	4,981	47			

## Annexe 13

### Effet de l'inoculation sur le pois sec

ANOVA					
poidssecs					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,005	7	,001	1,036	,422
Within Groups	,030	40	,001		
Total	,036	47			

## Annexe 14

### Effet de l'inoculation sur la partie aérienne

ANOVA					
lingueur_de_partie_aerienne					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	33,328	7	4,761	,879	,531
Within Groups	216,542	40	5,414		
Total	249,870	47			

## Annexe 15

### Effet de l'inoculation sur la partie racinaire

ANOVA					
lingueur_de_partie_racinaire					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	22,370	7	3,196	3,226	,008
Within Groups	39,625	40	,991		
Total	61,995	47			

## Résumé

L'agriculture moderne intensive s'est basée sur d'intrants chimiques. En plus des méfaits néfastes vérifiés de ces produits chimiques, actuellement ils sont considérés comme des principaux polluants de l'environnement ayant engendrés la détérioration des propriétés biologiques des sols et l'accumulation de résidus chimiques dans les produits agricoles récoltables. L'utilisation de PGPR est une voie biologique alternative proposée pour remédier à cette situation. Un essai a été réalisé sous des conditions semi contrôlées sur le petit pois (*Pisum sativum* L.) inoculé par sept souches de *Pseudomonas* sp. isolées à partir de sol rhizosphérique. Leur effet sur la croissance des plantes est vérifié, ainsi que leur caractérisation phénotypique et biochimique. Le profil d'antibioestance montre que les souches sont révélées résistantes à tous les antibiotiques testés sauf à la Gentamicine. L'inoculation des souches n'a aucun effet sur la mise en place de la symbiose, et l'échec de la nodulation peut être du aux facteurs édaphiques défavorables. L'inoculation à améliorer le poids frais, et stimulée la croissance de la partie racinaire des plantes, et l'effet le plus remarquable a été enregistré par la souche (*Pseudomonas luteola* S7).

**Mots clés:** *Pisum sativum* L, PGPR, *Pseudomonas* sp, inoculation, nodulation

## Abstract

Modern intensive agriculture is based on chemical inputs. In addition to the verified harmful effects of these chemicals, they are currently considered to be major environmental pollutants, having led to the deterioration of soil biological properties and the accumulation of chemical residues in harvestable agricultural produce. The use of PGPR is an alternative biological pathway proposed to remedy this situation. A trial was carried out under semi-controlled conditions on peas (*Pisum sativum* L.) inoculated with seven strains of *Pseudomonas* sp isolated from rhizospheric soil. Their effect on plant growth was verified, as was their phenotypic and biochemical characterization. The antibioestance profile showed that the strains were resistant to all the antibiotics tested except Gentamicin. Inoculation of the strains had no effect on the establishment of symbiosis, and failure of nodulation may be due to unfavorable edaphic factors. Inoculation improved fresh weight, and stimulated growth of the root part of the plants, and the most remarkable effect was recorded by the strain (*Pseudomonas luteola* S7).

**Keywords:** *Pisum sativum* L, PGPR, *Pseudomonas* sp, inoculation, nodulation

## ملخص

تعتمد الزراعة الحديثة المكثفة على المداخلات الكيميائية. وبالإضافة إلى الآثار الضارة المؤكدة لهذه المواد الكيميائية، فإنها تعتبر حالياً الملوثات البيئية الرئيسية التي تسببت في تدهور الخصائص البيولوجية للتربة وتراكم المخلفات الكيميائية في المنتجات الزراعية القابلة للحصاد. استخدام PGPR هو مسار بيولوجي بديل مقترح لمعالجة هذا الوضع. تم إجراء اختبار في ظل ظروف شبه خاضعة للرقابة على البازلاء (*Pisum sativum* L.) التي تم تلقيحها بسبع سلالات من *Pseudomonas* sp معزولة عن التربة الريزوسفيرية. يتم التحقق من تأثيرها على نمو النبات، بالإضافة إلى توصيفها الظاهري والكيميائي الحيوي. يُظهر ملف مقاومة المضادات الحيوية أنه تم العثور على سلالات مقاومة لجميع المضادات الحيوية التي تم اختبارها باستثناء الجنتاميسين. ليس لتلقيح السلالات أي تأثير على وضع التعايش، وقد يكون فشل العقيدة بسبب عوامل إضافية معاكسة. أدى التلقيح إلى تحسين الوزن الطازج، وحفز نمو الجزء الجذري من النباتات، وتم تسجيل التأثير الأكثر بروزاً بواسطة السلالة (*Pseudomonas luteola* S7).

**الكلمات المفتاحية:** *Pisum sativum* L، PGPR، *Pseudomonas* sp، التلقيح، العقيدة.