

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

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention
Du diplôme de Master II en science de la nature et de la vie
Spécialité : Biologie des Interactions Plantes-Microorganismes

Thème :

**ESSAIS DE BIOCONTROLE DE LA FUSARIOSE VASCULAIRE DU
POIS PAR L'APPLICATION DES *RHIZOBIACEAE* ET L'ETUDE DE
LEUR EFFET SUR LA NODULATION**

Présenté par :

M^{elle} MAHMOUD Fatma & M^{elle} KESSARINE Hadda

Soutenu devant le jury composé de :

M ^{me} NEBIH D.	M.C.A	USDB ₁	Président de jury
M ^r BENCHABANE M.	Professeur	USDB ₁	Promoteur
M ^{elle} YALA A.	Post-graduant	USDB ₁	Co-promotrice
M ^{me} AMMAD F.	M.C.B	USDB ₁	Examinatrice
M ^{elle} MEKHALDI D.	Post-graduant	USDB ₁	Invitée

ANNEE UNIVERSITAIRE: 2015/2016

ESSAIS DE BIOCONTROLE DE LA FUSARIOSE VASCULAIRE DU POIS PAR L'APPLICATION DES *RHIZOBIACEAE* ET L'ETUDE DE LEUR EFFET SUR LA NODULATION

Résumé

L'objectif de notre travail, consiste à mettre en évidence, les potentialités antagonistes *in situ* et *in vitro*, de cinq souches rhizobactériennes (*Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicea*, *Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, *Pseudomonas fluorescens* F21) dans le biocontrôle du pois (*Pisum* spp) vis-à-vis de la Fusariose vasculaire. Les expérimentations ont été menées en interactions avec deux races de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (Fop) (R1 et R2F42) et cinq génotypes de pois (JI1412, Messire, JI1210, P21, et Kelvedone Wonder Peas).

Les essais d'application *in situ*, réalisés sous serre en verre, ont mis en évidence que les cinq souches bactériennes, ont montré une activité antagoniste vis-à-vis des deux souches de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (R1 et R2F42), en interaction avec les cinq génotypes de pois. Cet effet de biocontrôle est détectable durant les 31 jours de suivi du développement de la maladie, par le calcul de son taux d'infection, sa sévérité, ainsi que l'AUDPC qui permet d'évaluer la progression de la maladie durant la période d'expérimentation. Le génotype le plus sensible est le génotype P21 avec des valeurs d'AUDPC de 1100,36 (R1), et 2201.82(R2F42), alors que le génotype le plus résistant est le génotype Kelvedone Wonder Peas avec des valeurs de 1054,05(R1) et 1556(R2F42).

Les tests d'antagonisme *in vitro*, nous ont montré une activité inhibitrice des cinq souches bactériennes utilisées vis-à-vis des deux souches de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*, avec un taux d'inhibition maximal de 57,55% (*Mesorhizobium loti*).

En comparant les résultats *in situ* et *in vitro*, nous remarquons une correspondance, et nous constatons que la souche pathogène la plus virulente est Fop R2F42, et les souches antagonistes les plus performantes des cinq sont *Mesorhizobium loti* et *Pseudomonas fluorescens* (F21).

Mots clés: biocontrôle, *Plant Growth- Promoting Rhizobacteria*, nodulation, *Pseudomonas fluorescens*, *Pisum* spp., *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*.

BIOCONTROL TESTS OF FUSARIUM WILT BY APPLICATION RHIZOBIACEAE AND THE STUDY OF THEIR EFFECT ON NODULATION

Abstract

The aim of our work is to study the antagonistic and potentialities in situ and in vitro of five rhizobacterial strains (*Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium Leguminosarum* bv *Vicia*, *Mutant Rhizobium Leguminosarum* bv *viceae*, *Pseudomonas fluorescens* F21) in the biocontrol of peas (*Pisum* spp) against vascular wilt. The experiments were conducted in interaction with two virulent strains of *Fusarium oxysporum* f.sp.*pisi* of plant pathogen fusarium wilt (R1 and R2F42) and five pea genotypes (JI1412, Messire, JI1210, P21, and Kelvedone Wonder Peas).

In situ application of tests, made out in greenhouses, have highlighted that the five bacterial strains showed activity antagonistic against the two strains of *Fusarium oxysporum* f.sp.*pisi* (R1 and R2F42) interacting with five pea genotypes. This biocontrol effect is detectable during the 31 days of monitoring the development of the disease, by calculating the AUDPC for assessing the progress of the disease during the experimental period. According AUDPC (Area Under Disease Curve) Progress values ranging between 344,38 and 2201,82, the most susceptible genotype is P21 with values of AUDPC (1100,36) in interaction with the strain R1 and (2201,82) in interaction with the strain R2F42, and The genotype which is proven most resistant is Kelvedone Wonder Peas with values of AUDPC, (1054.05) in interaction with the strain R1 and (1556) in interaction with the strain R2F42.

In vitro, the results showed inhibitory activity recorded in all the bacterial strains used, the maximum rate of inhibition is recorded by *Mesorhizobium loti* (57, 55 %). According to these results, the most virulent pathogen strain is Fop R2F42, and most strains performing as biocontrol agents are *Pseudomonas fluorescens* (F21) and *Mesorhizobium loti*.

Keywords: biocontrol, *Plant Growth- Promoting Rhizobacteria*, nodulation, *Pseudomonas fluorescens*, *Pisum* spp, *Fusarium oxysporum* f . *pisi*

الملخص:

تجارب الحماية البيولوجية ضد الذبول الفزاري للباذلاء باستعمال *Rhizobiaceae* دراسة تأثيرها على

nodulation

الهدف من عملنا هو إبراز قدرات السلالات البكتيرية (*Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*)
,*Rhizobium Leguminosarum bv vicia*, *Mutant Rhizobium Leguminosarum bv viciae*

في الحماية البيولوجية لنبات البازلاء *Pisum spp* ضد الذبول الفزاري المسبب (*Pseudomonas fluorescens F21*) من طرف (*Fusarium oxysporum f.sp. pisi* (Fop) تحقيقا لهذه الغاية اجريت تجارب تفاعلية مع سلالتين من Fop (R1 و F2R42) و خمسة انماط وراثية لنبات البازلاء (Kelvedon ,P 21, Messire JI1210, JI1412) و (Wonder Peas).

التجارب في الظروف الشبه مراقبة (بيت زجاجي), برهنت أن استعمال السلالات البكتيرية النافعة له مفعول إيجابي في التقليل من حدة المرض لدى النباتات المطعمة, حيث قللت من نسب الإصابة و شدة الأعراض المرضية على الخمس أنماط لنبات البازلاء, هذا التأثير يمكن ملاحظته من خلال مراقبة تطور المرض, عن طريق حساب AUDPC (Area Under Disease Progress Curve) لتقييم تقدم المرض خلال الفترة التجريبية. حسب النتائج المتحصل عليها, النمط الوراثي الأكثر حساسية هو P21 مسجلة AUDPC (1100,36) بالتفاعل مع R1 Fop و (2201,82) بالتفاعل مع R2F42 Fop و النمط الوراثي الأكثر مقاومة هو Kelvedon Wonder Peas بمعدل (1054,05) بالتفاعل مع R1 Fop و (1556) بالتفاعل مع R2F42 Fop.

النتائج المتحصل عليها بعد إجراء التجارب المخبرية أظهرت مفعول إيجابي في تثبيط النمو الفطري مسجل لدى كل السلالات البكتيرية المستعملة, حيث سجلت أعلى نسبة لدى (*Mesorhizobium loti*) (57,55%).

بمقارنة النتائج المتحصل عليها في البيت البلاستيكي و النتائج المخبرية, نلاحظ توافق في النتائج, و يمكن أن نسجل أن

السلالة الأكثر شراسة هي R2F42, و السلالتين الأكثر فعالية ضد *Fusarium oxysporum f.sp. pisi*.

هما *Mesorhizobium loti* و (*Pseudomonas fluorescens* (F21)

الكلمات المفتاحية: الحماية البيولوجية, الريزوبيومات, PGPR, *Pseudomonas fluorescens* F21,

Nodulation, *Fusarium oxysporum f.sp. pisi* (Fop), البازلاء

REMERCIEMENTS

Au terme de ce modeste mémoire, nous remercions en premier lieu le Bon Dieu le tout puissant de nous avoir illuminées et ouvert les portes du savoir et nous avoir donné la volonté et le courage d'élaborer ce modeste travail.

Tout d'abord, nous tenons à exprimer nos profonds remerciements, notre vive reconnaissance au Professeur **M. BENCHABANE**, pour avoir accepté de nous encadrer et de suivre ce travail.

Un grand merci est réservé à **M^{elle} YALA .A**, co-promotrice de ce travail, ça ne sera pas suffisant pour lui exprimé tout notre grande reconnaissance pour son grand soutien lors de ce travail.

Nos vifs remerciements s'adressent à **M^{me} NEBBIH.D** qui nous fait l'honneur de présider ce jury.

Nous sommes très reconnaissantes à **M^{me} AMMAD.F**, d'avoir accepté l'évaluation de ce mémoire et d'en être l'examinatrice.

Nous tenons également à remercier **M^{me} FADIL Djamila**, Ingénieur au laboratoire de Mycologie, pour ces encouragements et sa gentillesse, et ses conseils et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce travail.

Nous remercie **M^{elle} MEKHALDI .D** pour sa présence, et sa disponibilité.

Nous tenons à remercier **BOUARAR Walid**, ingénieur de laboratoire de virologie, pour son aide et sa gentillesse.

Nous adressons également nos remerciements, à tous nos enseignants, qui nous ont donné les bases de la science, en particulier **M^{me} KRIMI**, **M^{me} BELKAHLA**, **M^{me} BENCHABANE**, **M^{me} BOUCHENAK**, **M^{me} AMMAD** et bien sure notre promoteur **Mr BENCHABANE**.

Enfin nous remercie toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont participé à l'élaboration de ce mémoire.

Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail aux personnes qui m'ont toujours
aimé, supporté,*

*conseillé, poussé à m'améliorer, dont le mérite, les sacrifices
et les qualités humaines,*

on fait de moi ce que je suis aujourd'hui;

Mon extraordinaire mère, Mon exceptionnel père,

A mon cher frère Mourad.

A mes chères sœurs Radhia et Louiza

A tous mes cousins et mes cousines.

A mon adorable tante Akila.

A toute ma grande famille Kessarine.

*A tous mes amis : l'incroyable, le rare et celle qui mérite le
titre d'ami avec excellence: Rahma, Nedjma, Nacira,
Halima, Samira, Zahra et Zineb.*

*Sans oublier ma chère binôme Fatma la personne qui
m'avait toujours soutenue et aidée partagée tous le
parcours et tous les moments de réalisation de ce travail*

Merci pour tous ce que vous avez fait.

A toute ma promotion BIPM (2015/2016) sans exception.

A tous ceux que j'aime.

Hadda. K

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail et ma réussite à ma chère mère que j'aime énormément et qu'elle trouve ici toute ma gratitude pour son soutien tout au long de mes études.

A mes frères Fayçal, Mouhamed.

A mes sœurs Nassima, Fouzia, Nessrine.

A mon beau frère Nouredine.

A mes chères cousines Manel, Meriem, Affaf, Noura, Fatouma, Imene, Laïla.

A mes cousins Hamza et Samir.

A toute ma grande famille.

A la personne qui j'ai l'honneur de partager la réalisation de ce travail, ma chère copine et mon binôme Hadda.

A mes très chères amies Rahma et Nedjma, Nacira, Imene, Zahra et Zineb.

A tout ma promotion BIPM (2015/2016) sans exception.

M. Fatma

Table des matières

RESUMÉ

ABSTRACT

REMERCIEMENTS

DÉDICACES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

INTRODUCTION 1

CHAPITRE 1 : DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Les rhizobactéries 3

1.1. Rhizobactéries non-symbiotiques: *Pseudomonas fluorescens*..... 4

1.1.1. Classification du genre *Pseudomonas*..... 5

1.1.2. Mécanismes d'action de *Pseudomonas* spp. fluorescent..... 6

1.1.2.1. Mécanismes directes..... 6

1.1.2.1.1. Amélioration de la croissance des plantes..... 6

1.1.2.1.2. Protection des plantes contre les maladies d'origine tellurique..... 6

1.1.2.1.3. Stimulation de la germination..... 7

1.1.2.1.4. Stimulation des interactions entre la microflore symbiotique et la plante hôte..... 7

1.1.2.1.5. L'antibiose..... 8

1.1.2.2. Mécanismes indirectes..... 8

1.1.2.2.1.	La résistance systémique induite (ISR).....	8
1.1.2.2.2.	La compétition trophique.....	9
1.1.2.2.3.	Les métabolites secondaires.....	10
1.2.	Rhizobactéries symbiotiques: <i>Rhizobium sp</i>	11
1.2.1.	Rhizobium spp.....	11
1.2.2.	La symbiose fixatrice d'azote.....	11
1.2.3.	La symbiose rhizobium/légumineuses.....	11
1.2.4.	Le nodule.....	12
1.2.5.	Processus de la fixation symbiotique de l'azote.....	14
1.2.6.	Les gènes de nodulation.....	14
1.2.7.	Processus de la nodulation.....	15
2.	POIS.....	18
2.1.	Généralité sur le pois.....	18
2.2.	Importance économique.....	18
2.3.	Taxonomie.....	19
2.4.	Biologie.....	20
2.5.	Facteurs limitant la production.....	20
2.5.1.	Stress abiotiques.....	20
2.5.2.	Stress biotique.....	21
3.	La fusariose vasculaire.....	21

3.1. <i>Fusarium oxysporum</i>	22
3.1.1. Généralités.....	22
3.1.2. Taxonomie.....	22
3.1.3. Caractéristiques biologiques.....	23
3.1.4. Cycle de vie.....	24
3.1.4.1. Pénétration du pathogène dans la racine.....	24
3.1.4.2. Propagation du pathogène à l'intérieur de la racine.....	25
3.1.4.3. Propagation du pathogène dans la tige.....	25
3.1.4.4. Reprise de la phase parasitaire.....	25
3.1.5. Symptomatologie.....	26
3.1.6. Les races de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>pisi</i>	27
3.1.7. Moyen de lutte.....	27

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel biologique.....	29
1.1. Matériel végétal	29
1.2. Isolats fongiques phytopathogènes	29
1.3. Isolats bactériens.....	30
2. Antagonisme in situ.....	30
2.1. Désinfection des semences	30
2.2. Préparation de l'inoculum	31
2.2.1. Inoculum fongiques.....	31

2.2.2. Inoculum bactériens.....	31
2.3. Inoculation des plantules	31
2.4. Dispositif expérimental	33
2.5. Paramètres étudiés.....	34
2.6. Effet de nodulation	35
3. Antagonisme in vitro.....	35
4. Analyse statistique.....	36

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS et DISCUSSION

1. Résultats d'antagonismes in situ.....	37
1.1. Taux d'infection des génotypes étudiés.....	37
1.2. Sévérité de la maladie.....	42
1.3. L'AUDPC.....	46
1.4. Effet de nodulation.....	48
2. Discussion d'antagonisme in situ.....	48
3. Résultats d'antagonisme in vitro.....	50
3.1. Inhibition de la croissance mycélienne.....	51
4. Discussion d'antagonisme in vitro.....	53
CONCLUSION.....	56
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	59

ANNEXES

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AUDPC: *Area Under the disease progress curve*

°C : Degré Celsius

C.F.U: Cells forming unities

cm: Centimètre

Do: Densité optique

EDS: eau distillé stérile

Fop: Fusarium oxysporum f.sp pisi.

f.sp: Forme spéciale

g : Gramme

% : Pourcentage.

h : Heure

min: Minute

mm : Millimètre.

µm : Micromètre.

pH : Potentiel Hydrogène

Pf : Pseudomonas fluorescens.

PGPR: *Plant Growth-Promoting*

Rhizobacteria

Meso: *Mesorhizobium loti*

Sino: *Sinorhizobium meliloti*

RL: *Rhizobium Legumerusarum bv vicea*

RL M: *Mutant Rhizobium Legumerusarum bv viceae*

LISTE DES FIGURES

Figure1 : <i>Pseudomonas fluorescens</i>	4
Figure2 : <i>Sinorhizobium meliloti</i>	11
Figure 3 : Différents stades de développement des nodosités de type indéterminé et déterminé.....	13
Figure 4 : Echanges de signaux lors de la mise en place de la symbiose Rhizobium/légumineuse Nod-dépendant.....	15
Figure 5 : Structure du facteur Nod produit par la bactérie <i>Sinorhizobium meliloti</i> , symbiote de la légumineuse <i>Medicago truncatula</i>	16
Figure 6 : Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice de l'azote.....	17
Figure 7 : Nodules racinaire chez la légumineuse modèle <i>Medicago truncatula</i>	17
Figure 8 : Structure d'une plante du pois.....	20
Figure 9 : Représentation des formes de reproduction de <i>Fusarium oxysporum</i>	24
Figure 10 : Cycle infectieux de <i>Fusarium oxysporum</i>	26
Figure 11 : Symptômes de la fusariose vasculaire du pois.....	27
Figure 12 : Vue sur le terrain affecté par la fusariose.....	27
Figure13 : Les deux souches de <i>fusarium oxysporum</i> f sp <i>pisi</i> utilisées.....	29
Figure 14 : stade de deux à trois nœuds.....	32
Figure 15 : Inoculation bactérienne.....	32
Figure 16 : Inoculation fongique.....	32
Figure 17 : Dispositif expérimental.....	33
Figure 18 : Echelle de l'évaluation des symptômes de la fusariose vasculaire.....	34
Figure 19 : La méthode des spots	36
Figure 20 : Exemple d'expression symptomatologique sur génotype JI1412.....	46
Figure 21 : Exemple d'expression symptomatologique sur génotype P21.....	46

Figure 22: AUDPC sur les cinq géotypes de pois.....48

Figure 23: Exemples des activités antagonistes de la souche *Mesorhizobium loti* vis-à-vis des deux souches de *Fusarium oxysporum* f.sp. pisi après 24h, 48h sur milieu YMA.....53

Liste des Tableaux

Tableau 1: Exemples d'associations entre <i>rhizobia</i> et Légumineuses.....	13
Tableau 2: Génotypes étudiés.....	29
Tableau 3: Les souches bactériennes.....	30
Tableau 4: Traitements étudiées.....	33
Tableau 5 : Taux d'infection (%) de génotypes JI1412.....	38
Tableau 6 : Taux d'infection (%) de génotypes Messire.....	39
Tableau 7: Taux d'infection (%) de génotypes JI1210.....	40
Tableau 8: Taux d'infection (%) de génotypes P21.....	41
Tableau 9: Taux d'infection (%) de génotypes Kelvedon Wonder Peas.....	42
Tableau 10: Sévérité des symptômes des génotypes étudiés non bactérisés.....	43
Tableau 11: Sévérité des symptômes des génotypes étudiés bactérisés en interaction avec Fop R1.....	44
Tableau 12: Sévérité des symptômes des génotypes étudiés bactérisés en interaction avec Fop R2F42.....	45
Tableau 13: Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne de FopR1 sur les cinq milieux de culture après 24h, 48h, et 72h.....	52
Tableau 14: Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne de FopR2F42 sur les cinq milieux de culture après 24h, 48h, et 72h.....	52

INTRODUCTION

Les pesticides sont largement utilisés en agriculture pour améliorer le rendement des cultures. Cependant, les produits chimiques ont des résidus qui peuvent influencer sur le système écologique, la fertilité des sols et des eaux souterraines, suscitant ainsi des problèmes écologiques et de santé (Guanpeng *et al.*, 2012). En raison de l'aggravation de ces problèmes suscités, une recherche sérieuse est nécessaire pour identifier des méthodes alternatives pour la protection des végétaux, qui sont moins dépendantes aux produits chimiques et sont plus respectueuses à l'environnement (Prapagdee *et al.*, 2008).

Ces dernières années, la lutte biologique éveille un intérêt grandissant pour la protection des plantes, elle est considérée comme étant l'une des méthodes les plus prometteuses, elle consiste en l'utilisation des microorganismes antagonistes, dont les plus utilisés nous avons les rhizobactéries (Guanpeng *et al.*, 2012).

Ces bactéries antagonistes sont capables de se multiplier et de rivaliser avec les autres microorganismes, pour occuper une zone riche en éléments nutritifs qui est la rhizosphère. L'association, le rôle et les effets que les rhizobactéries exercent sur la plante sont fonction du succès de leur établissement au niveau de cette rhizosphère (Beauchamp, 1993).

Ces rhizobactéries sont alors reprises sous le terme de PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* ou Rhizobactéries promotrices de croissance des plantes). Ces PGPR ont tendance à avoir un effet bénéfique sur les plantes colonisées, qui peut impliquer différents modes d'action : nous avons les PGPR phytoprotectrices, qui protègent les plantes et stimulent donc indirectement leur croissance, et nous avons les PGPR phytostimulatrices qui stimulent directement la croissance racinaire via la synthèse d'hormones ou la fixation d'azote, ce qui augmente les capacités d'absorption d'eau et de composés minéraux nécessaires à la plante (Bashan et Holguin, 1998).

Les PGPR peuvent être divisés en deux groupes majeurs selon leur relation avec la plante hôte, nous avons les bactéries non symbiotiques et les bactéries symbiotiques (Khan et Zaidi, 2005).

Chez les bactéries non symbiotiques, nous avons les *Pseudomonas* spp. fluorescents qui font l'objet d'une attention particulière. Leur utilisation dans l'agriculture en tant que biofertilisants offre un bon rendement même dans des conditions sévères (Ali *et al.*, 2009 ; Bano et Fatima, 2009). Elles sont connues pour leurs effets positifs sur les plantes par leur protection contre les agents phytopathogènes ou via la stimulation de leur croissance (Lemanceau, 1992).

Chez les bactéries symbiotiques, nous avons les rhizobiums qui sont connues pour leur relation symbiotique avec les légumineuses, menant à la fixation d'azote atmosphérique. Cette symbiose est une composante importante des agrosystèmes, vu ses intérêts agronomiques, économiques et écologiques, en effet, elle peut, assurer une nutrition azotée adéquate aux plantes.

L'étude des propriétés antagonistes des PGPR phytoprotectrices a concerné principalement les interactions avec les agents fongiques phytopathogènes, et parmi les agents phytopathogènes les plus redoutables nous avons *Fusarium oxysporum* agent de la fusariose vasculaire (Ryder *et al.*, 1990).

Cet agent pathogène présente plusieurs formes spéciales causant des pertes économiques considérables, dont *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (Fop) agent responsable de la fusariose vasculaire du pois (Snyder et Hansen, 1940), Cette maladie a été signalée dans tous les pays où le pois est cultivé commercialement, elle est souvent sévère et il en résulte des pertes considérables (Kraft, 1994).

L'objectif de notre travail consiste à apporter un plus dans la lutte biologique, par la mise en évidence des potentialités antagonistes de cinq souches rhizobactérienne. Pour cela, nous avons expérimenté *in vitro* les effets antagonistes de quatre souches de rhizobiaceae (*Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, *Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *Viceae*) et d'une souche du genre *Pseudomonas* (Pf F21), vis-à-vis de deux isolats fongiques de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (FopR1 et FopR2F42). Les mêmes souches ont été expérimentées *in situ* en interaction avec cinq génotypes de pois (JI1412, Messire, P21, JI1210 et Kelvedon Wonder Peas).

Chapitre1 :

Données bibliographiques

1. Les rhizobactéries

Dans le sol, l'activité microbienne est intense en particulier dans la zone sous l'influence des racines, la rhizosphère, qui contient plus d'un million de microorganismes par gramme de sol. Certains de ces microorganismes, principalement des rhizobactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. Ces bactéries sont alors reprises sous le terme de PGPR, un terme introduit par Kloepper et Schroth (1978).

Les PGPR sont un groupe de bactéries qui colonisent la rhizosphère et permet la croissance des plantes (Gnanamanickam, 2007), et ils sont également nommé PHPR (Plant Health Promoting Rhizobacteria), ou NPR (Nodule Promoting Rhizobacteria) (Hayat et *al*, 2010)

Certaines bactéries PGPR sont utilisées en tant qu'inoculant pour améliorer le développement des racines via la production de certaines phytohormones (Bloemberg et Lugtenberg, 2001), telles que des auxines dont l'acide indole acétique (AIA), des cytokinines et des gibbérellines (Vessey, 2003). Par ailleurs, de nombreuses bactéries sont capables d'améliorer la santé des plantes en limitant la croissance des microorganismes phytopathogènes, principalement via la compétition et l'antibiose, certaines sont utilisées en agriculture comme agents de lutte biologique (Bloemberg et Lugtenberg, 2001; Whipps et *al*, 2001). Comme il s'est avéré aussi que certaines souches de PGPR peuvent protéger les plantes d'une façon indirecte par la stimulation de mécanismes de défense inductibles dans la plante, ce qui peut rendre l'hôte beaucoup plus résistant à l'agression future par des agents pathogènes. Ce phénomène a été nommé «résistance systémique induite» (ISR, Induced Systemic Resistance) (Van Loon et *al*. 1998; Pieterse, et *al*. 2002).

Toutes les études montrent que les PGPR sont efficaces aussi bien sur les dicotylédones (pois, concombre, radis, tabac, tomate), que sur les monocotylédones (riz, maïs, canne à sucre). Généralement la protection est de moins longue durée lorsqu'elle est induite par un agent pathogène que lorsque l'on utilise des PGPR.

Les PGPR peuvent être divisés en deux groupes majeurs selon leur relation avec la plante hôte (Khan et Zaidi, 2005) :

- Des rhizobactéries non symbiotique qui restent à l'extérieur des cellules des plantes (PGPR extracellulaires : *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*...ect).
- Des rhizobactéries symbiotiques qui pourraient envahir l'intérieur des cellules végétales (PGPR intracellulaires: *Rhizobium spp*).

1.1. Rhizobactéries non-symbiotiques: *Pseudomonas fluorescens*

Parmi les rhizobactéries non symbiotiques, *Pseudomonas fluorescens* fait l'objet d'une attention particulière. L'attention reçue par cette bactérie provient surtout de son potentiel à réduire les dégâts causés par certaines maladies fongiques s'attaquant à des plantes cultivables (Pant et al, 2001). L'inoculation des plantes à l'aide de certaines souches de *Pseudomonas spp.*, s'accompagne en effet d'une augmentation significative du rendement de la culture, et elle est exploitée commercialement (traitement des graines) en protection des plantes pour induire la résistance systémique contre différents ennemis et maladies (Mezaache, 2012).



Figure1 : *Pseudomonas flurescens* contiennent des pigments fluorescents de couleur verte (Pyoverdine) (<http://organicsoiltechnology.com/wp-pseudomonas-fluorescens-makes-phosphorus-availabl-1.jpg>)

1.1.2. Classification du genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* fait partie de la famille des *Pseudomonadaceae*, ceux-ci sont connus pour leur diversité métabolique ainsi que leur caractère bioactif et leur capacité à coloniser agressivement un milieu (Aberoumand, A. 2010). Ce genre est composé de bactéries à Gram négatif, en forme de bacilles avec multiples flagelles et chimio-organotrophes. La fluorescence est due à la production d'un pigment fluorescent jaune-vert appelé pyoverdine soluble dans l'eau et insoluble dans le chloroforme (Paulsen, et al. 2005; Wong et al. 2011; Gao et al, 2012; Trögl, et al, 2012) (Figure 1).

Les espèces du genre *Pseudomonas* peuvent jouer un rôle de phytopathogènes (*P. syringae*), de pathogènes d'animaux (*P. aeruginosa*), d'agents de biorestauration, de pourrisseurs alimentaires, ou encore d'agents de biocontrôle. (Cappe et al, 1994). Chez les espèces présentant un potentiel en biorestauration, on retrouve *P. putida* capable d'utiliser le toluène et *Pseudomonas alcaligenes* qui dégrade les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Dagher, 1997). En ce qui concerne le trait de pourrisseurs, *Pseudomonas fragi* et *Pseudomonas ludensis* causent une multitude de problèmes dans l'industrie alimentaire (Cruden, 1992 et Parker, 1953), et pour ce qui est des agents de biocontrôle, *P. fluorescens*, constituent les espèces les plus étudiées contre les micromycètes parasitiques, notamment *Fusarium* sp. ou *Pythium* sp et certains nématodes (Chin-A-Woeng, 1998).

Les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents sont parmi les plus abondantes dans la rhizosphère. Dans certains cas, elles représentent plus de 60% de la microflore bactérienne totale du sol (Digat et Gardan, 1987), d'où leur application comme agents de contrôle biologique grâce à leurs abondance dans les sols naturels et les racines des plantes (Sands et Rovira, 1971). Ces bactéries sont d'excellents compétiteurs vis-à-vis de la microflore fongique et bactérienne du sol par leur temps de génération *in situ* relativement court (Garbaye, 1994), leur capacité à utiliser les exsudats de plantes comme nutriments (Lugtenberg et al., 2002), et à chélater les ions ferriques (Garbaye, 1994), produisent des antibiotiques (Garbaye, 1994 ; Natsch et al.,

1994), et des enzymes hydrolytiques (Lim et al., 1991; Neilsen et al., 1998; Neilsen et Sorensen, 1999).

1.1.3. Mécanismes d'action de *Pseudomonas* spp. fluorescent

Les capacités antagonistes des PGPR, sont dues principalement à des mécanismes directs et indirects .

1.1.3.1. Mécanismes directes

1.1.3.1.1. Amélioration de la croissance des plantes

L'utilisation de certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents aptes à se maintenir et à se développer sur le système racinaire, s'accompagne d'effets bénéfiques significatifs pour les plantes inoculées. La finalité de la bactérisation est l'augmentation du rendement des cultures par la stimulation de croissance des plantes (Lemanceau, 1992).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont connues comme promotrices de la nutrition et la croissance des plantes, par la solubilisation de minéraux comme la solubilisation de formes de phosphore insolubles rendant ainsi le phosphore biodisponible, par la production de sidérophores ou par la production de régulateurs de croissance phytohormones comme les auxines (Lemanceau, 1992).

1.1.3.1.2. Protection des plantes contre les maladies d'origine tellurique

Au cours des dernières années, des recherches ont illustré le potentiel d'exploiter certaines bactéries pour contrôler plusieurs maladies affectant les racines des plantes. Des bactéries capables de produire des hormones, stimulant la croissance végétale ou renforçant leurs défenses ont même été isolées de plusieurs rhizomes, plusieurs de ces bactéries fluorescentes produisent également de nombreux composés avec activité antibiotique jouant un rôle dans la lutte biologique (Lemanceau, 1992).

Par exemple, des souches de *P. fluorescens* ont été impliquées dans le contrôle de *Phytophthora* chez le soja, de *Thielaviopsis basicola* chez le tabac (Keel, 1989), d'*Erwinia carotovora* chez la patate, de *Fusarium*

chez plusieurs végétaux et d'autres maladies fongiques chez le citron, l'orange et même certaines plantes ornementales . (Schnider-Keel, 2000, Kloepper, 1980, Lifshitz, 1986, Gardner, 1984, et Xu, 1986)

1.1.3.1.3. Stimulation de la germination

Certaines souches bactériennes, appartenant en particulier au groupe des *Pseudomonas* spp fluorescents, semblent améliorer la germination des graines lorsque les conditions d'environnement sont défavorables.

Ainsi Kloepper et *al.* (1986), ont montré que le taux de germination de graines de colza, semées dans un sol froid et battant, pouvait être significativement augmenté grâce à l'inoculation par certaines souches bactériennes. De même Hofte et *al.* (1991), ont enregistré une augmentation significative du taux de germination de semences de maïs soumises au froid après inoculation de deux souches de *Pseudomonas fluorescens*, l'une d'entre elles a de plus permis de maintenir le pourcentage de germination d'un lot de semences âgé de deux ans au même niveau que celui uniquement âgé de un an. Ces souches sont appelées « Emergence Promoting Rhizobacteria » (EPR) (Kloepper et *al.*, 1986).

Digat et *al.* (1990) ont montré que certaines souches de *Pseudomonas* peuvent stimuler significativement la germination de graines de tomate même lorsque les conditions d'environnement semblent défavorables.

1.1.3.1.4. Stimulation des interactions entre la microflore symbiotique et la plante hôte

Certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents stimulent la nodulation des légumineuses. Ainsi, Grimes et Mount (1987), ont montré qu'une souche de *P.putida* augmente de façon significative la nodulation de l'haricot par les *Rhizobium*. De même, Polonenko et *al.* (1987), ont montré que certaines rhizobactéries pouvaient améliorer la nodulation du soja par *Bradyrhizobium*. Ces souches sont appelées "Nodularing Promoting Rhizobacteria (NPR)".

Toutes ces souches stimulent la croissance racinaires, produisent de l'acide indole acétique et sont pectinolytiques. Elles provoquent une augmentation de la masse de nodosités plutôt que de leur nombre (Lemanceau, 1992).

De même, certaines souches de bactéries influencent positivement la colonisation racinaire de la plante hôte par des endomycorhizes (von Alten et al, 1991), ou par des ectomycorhizes (Garbaye et Bowen, 1987). Mamoun et Olivier (1992) ont montré que certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents améliorent la pérennité de l'association symbiotique entre l'ectomycorhize *Tuber melanosporum* et le noisetier. Ainsi l'association d'endomycorhizes et de *Pseudomonas* spp. fluorescents s'accompagne d'une plus grande stimulation de la croissance de la plante que la seule inoculation bactérienne ou fongique (Meyer et Linderman, 1986; Oliveira et al, 1987)

1.1.3.1.5. L'antibiose

L'antibiose est définie comme « l'inhibition d'un organisme par le produit métabolique d'un autre organisme » (Cook et Baker, 1974), « une production métabolique aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques) (De Souza et al, 2003). La production d'antibiotiques par les *Pseudomonas* est désormais reconnue comme un facteur important dans le contrôle de plusieurs maladies, ce genre bactérien produit une myriade de composés présentant des activités antimicrobiennes, notamment; les phénazines (Thomashow et Weller, 1988), la pyolutéorine (Howell, et Stipanovic, 1979.), la pyrrolnitrine (Howell et Stipanovic, 1980.), la tropolone (Lindberg, 1981)et le 2,4-diacetylphloroglucinol (Keel et al 1990) . Leur spectre d'action varie grandement d'une molécule à l'autre. Ces métabolites produits à faibles concentrations peuvent inhiber la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents pathogènes (Montesinos et al, 2009).

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont connues pour leur activité antagoniste envers plusieurs phytopathogènes (Haas et Defago, 2005).

1.1.3.2. Mécanismes indirectes:

1.1.3.2.1. La résistance systémique induite (ISR)

Certaines souches de PGPR peuvent protéger les plantes d'une façon indirecte par la stimulation de mécanismes de défense inductibles dans la plante, ce qui peut rendre l'hôte beaucoup plus résistant à l'agression future par des agents pathogènes. Ce phénomène a été nommé «résistance systémique induite» (ISR, Induced Systemic Resistance) (Van Loon et al. 1998; Pieterse, et al. 2002). Il a été démontré également que *Pseudomonas* spp. fluorescents peuvent jouer le rôle d'éliciteurs sur l'activation des gènes de défense des plantes (Soylu et al, 2002).

Le rôle de l'antagonisme direct, entre la souche de *Pseudomonas* et celle de *Fusarium* pathogène, dans la protection biologique a pu être exclu grâce à des inoculations séparées dans l'espace: inoculation racinaire pour la souche bactérienne, inoculation dans la tige pour le *Fusarium*. De plus, l'induction de résistance de plantes ainsi inoculées est associée à une augmentation de la synthèse de phytoalexines comparées à celle des plantes témoins inoculées avec le *Fusarium* pathogène (Lemanceau, 1992).

1.1.3.2.2. La compétition trophique

La compétition trophique s'exerce essentiellement pour les exsudats racinaires et pour le fer. La biodisponibilité du fer dans un environnement comme la rhizosphère constitue souvent un facteur limitant la croissance microbienne, il s'en suit une compétition pour l'acquisition du métal présent en quantité limitée (O'Sullivan et O'Gara, 1992). Au fil du temps, plusieurs organismes ont développé des stratégies d'acquisition du fer en synthétisant des molécules appelées sidérophores, servant à s'emparer du fer, le rendant ainsi plus soluble et disponible pour leur croissance. Ces sidérophores sont caractérisés par leur faible masse moléculaire, leur forte spécificité au Fe^{+3} , ainsi que leur biosynthèse contrôlée par la disponibilité du fer (Neilands, 1981).

Le contrôle des organismes néfastes s'effectue donc par le biais de la séquestration du fer en complexe sidérophore-fer, assimilable uniquement par un organisme possédant les récepteurs spécifiques au complexe. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents produisent des sidérophores à très forte affinité avec le fer, appelés pyoverdines ou pseudobactines (Lemanceau, 1992), qui

permettent d'une part la chélation du fer, et d'une autre part la croissance des *Pseudomonas*, qui sont inoffensives pour les plantes avoisinantes, ainsi elles exclut par compétition trophique les autres organismes du milieu (Cline, 1982 et Cline, 1984). La carence en fer dans l'environnement a tendance à inhiber la germination des spores de certain agent pathogène tel que *Fusarium oxysporum*. Comme il est à signaler que certains végétaux peuvent obtenir leur fer par le détournement de sidérophores bactériens (Elad, et Baker. 1985)

1.1.3.2.4. Les métabolites secondaires

D'autre part, les métabolites secondaires jouent des rôles variés, puisqu'ils sont produits en grand nombre et qu'ils possèdent des structures moléculaires diversifiées. Ces molécules présentant une activité antimicrobienne sécrétées par certains *P. fluorescens*, tels que le 2,4-diacétylphloroglucinol, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine, les rhamnolipides, la mupirocine, le cyanure d'hydrogène, certains sidérophores et les phénazines (Whatling, et al, 1995, Dwivedi, et Johri. 2003, Lee, 2003).

Par exemple la production de HCN par les *Pseudomonas* est impliquée dans la suppression d'agents pathogènes comme *Thielaviopsis basicola*, *Septoria tritici* et *Puccinia recondita* (Ramette et al. 2003). Le composé agit directement sur les cellules de l'agent pathogène en bloquant le cytochrome oxydase dans la chaîne respiratoire.

Au niveau de l'adaptation à la rhizosphère, la production d'HCN peut être avantageuse pour acquérir des nutriments, l'HCN cause une augmentation de l'exsudation de nutriments par les tissus de la plante. Il peut aussi contribuer à l'acquisition de certains ions métalliques en formant des complexes avec ceux-ci (Blummer et al. 2000). De plus, en culture *in vitro*, la production d'HCN peut même inhiber la croissance de plusieurs champignons phytopathogènes (Blummer et al. 2000).

1.2. Rhizobactéries symbiotiques: *Rhizobium sp*

1.2.1. *Rhizobium spp.*

Les *rhizobiums* sont des bactéries du sol, appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*, Gram négatif, strictement aérobies, possédant une forme de bâtonnets et non sporulant. Ce sont des bactéries mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches (Figure 2). Leur croissance est optimale à une température de 28 °C et un pH entre 6 et 7. Les *rhizobiums* se trouvent partout dans le monde, au niveau des racines, comme ils peuvent également être trouvés dans le sol autour des plantes (Sana Dhane Fitouri, 2011).



Figure2: *Sinorhizobium meliloti*. (<http://www.sinorhizobium.org>)

1.2.2. La symbiose fixatrice d'azote

L'azote est essentiel à la croissance des végétaux, notamment pour la synthèse des acides nucléiques et des protéines. Présent en abondance sur terre, toutes les formes de l'azote ne sont cependant pas assimilables par les végétaux (78% de l'atmosphère). La symbiose fixatrice d'azote entre rhizobactérie-plante, permet au végétal d'assurer 40% à 90% de ses besoins azotés (le complément étant apporté par assimilation de l'azote minéral présent dans le sol), en échange, les bactéries bénéficient d'une source de carbone (produits de la photosynthèse). (Stacey et al, 2006).

1.2.3. La symbiose rhizobium / légumineuses

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse est le résultat d'une interaction hautement spécifique entre la plante et la bactérie. A la suite de mécanismes complexes de reconnaissance entre les deux organismes, notamment via un dialogue moléculaire, la bactérie induit chez la légumineuse la formation sur les

racines d'un organe spécialisé, le nodule, à l'intérieur duquel la bactérie intracellulaire, se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant, via le complexe de nitrogénase (Perret *et al.*, 2000 ; Gibson *et al.*, 2008). En conditions de faible teneur en oxygène, cette enzyme catalyse la réduction de l'azote atmosphérique (N₂) en ammoniac (NH₃) (Day *et al.*, 2001 ; Downie, 2005). Certaines légumineuses sont également capables de former des nodules sur les tiges, appelés nodules caulinaires (Dreyfus et Dommergues, 1981 ; Giraud et Fleischman, 2004) (Tableau 1).

Les interactions légumineuses-rhizobiums se produisent dans la rhizosphère, suite à la libération de molécules carbonées (sucres, acides organiques, hormones, vitamines et substances phénoliques) par exsudation, sécrétion, ou autolyse des vieilles cellules de la racine (Seneviratne et Jayasinghearachchi, 2003). Beaucoup des substances organiques libérées par les racines ont un faible poids moléculaire et sont donc facilement décomposables par les micro-organismes, cela conduit à l'existence d'une grande communauté microbienne autour de la racine. (Begum *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2012).

Ce processus biologique joue un rôle essentiel dans l'agriculture durable, car il réduit l'apport en engrais azoté exogène tout en fournissant un moyen efficace de produire des aliments riches en protéines (Hirsch *et al.*, 2001).

1.2.3.1. Le nodule

Le nodule est un nouvel organe produit par la plante hôte au sein duquel les bactéries, différenciées en bactéroïdes, fixent l'azote atmosphérique (Figure3). Pour permettre une activité optimale de la nitrogénase, enzyme irréversiblement inactivée par l'oxygène, la plante maintient les nodules en condition de micro-oxygène grâce au parenchyme nodulaire pendant que la leghémoglobine transporte et tamponne la concentration d'oxygène indispensable à la respiration (Ott *et al.*, 2005).

Tableau 1: Exemples d'associations entre rhizobia et Légumineuses.
(Denarie et al, 1992 et Sawada et al., 2003).

Rhizobia	Plantes hôtes
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Luzerne (<i>Medicago</i> sp)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
<i>biovar viciae</i>	Pois (<i>Pisum</i>), Vesce (<i>Vicia</i>)
<i>biovar trifolii</i>	Trèfle (<i>Trifolium</i>)
<i>biovar phaseoli</i>	Haricot (<i>Phaseolus</i>)
<i>Mesohizobium loti</i>	Lotier (<i>Lotus</i>)
<i>Sinohizobium fredii</i>	Soja (Glycine)
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	Large spectre et Parasponia (non légumineuse)
<i>Rhizobium tropicii</i>	Haricot (<i>Phaseolus</i>), Faux Mimosa (<i>Leucaena</i>)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Soja (Glycine)
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	Sesbania

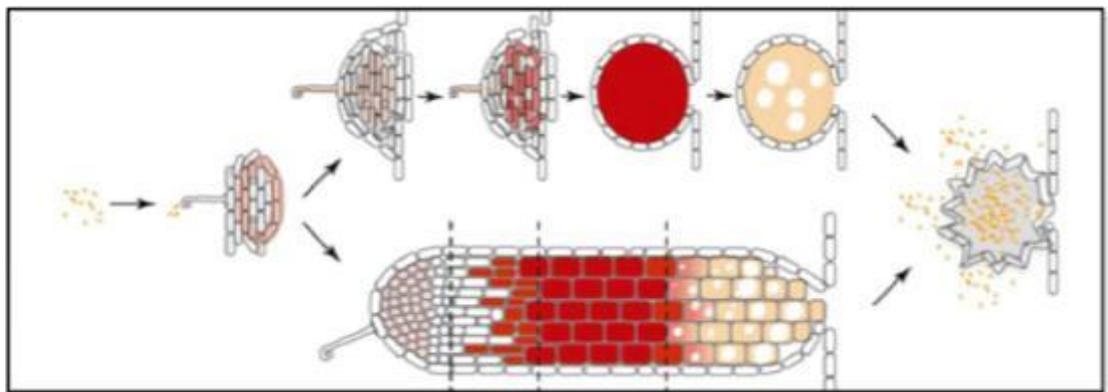


Figure 3: Différents stades de développement des nodosités de type indéterminé (en haut du schéma) et déterminé (en bas) (Schumpp Deakin, 2010).

1.2.3.2. Processus de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique

La fixation d'azote est la réduction du N₂ en NH₃ catalysée par le complexe enzymatique de la nitrogénase selon la réaction suivante (Kaminski et *al.*, 1998) :



La fixation de l'azote est un processus très exigeant en énergie, qui nécessite 16 molécules d'ATP pour réduire une molécule de N₂ en NH₃. Le fonctionnement de la fixation d'azote nécessite la contribution des deux partenaires : La plante fournit un environnement microaérobie, de l'énergie et des sources de carbone nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase, et le bactéroïde qui fournit la machinerie génétique pour la synthèse de la nitrogénase responsable de la fixation de l'azote : ce sont les gènes *nif* et *fix*.

✓ Les gènes *nif* codent pour la biosynthèse de la nitrogénase (Fisher 1994 ; Newton, 2007).

✓ Les gènes *fix* sont des gènes essentiels à la fixation d'azote mais sont rencontrés uniquement chez les micro-organismes fixateurs symbiotiques (Fisher, 1994 ; Lodwig et Poole 2003 ; Masson-Boivin et *al.*, 2009).

La nitrogénase est un complexe enzymatique très sensible à l'oxygène, qui est rapidement inactivé dans un environnement aérobie. La nodosité lui confère une niche protectrice grâce à la présence d'une protéine végétale, la leghémoglobine qui fixe l'oxygène et permet de le maintenir à faible pression partielle, elle se lie donc à l'oxygène en permettant de réguler la diffusion de celui-ci aux bactéroïdes (Ott et *al.*, 2005).

1.2.3.3. Les gènes de nodulation

Lors des étapes précoces de la symbiose, les substances émises par la légumineuse induisent chez les rhizobiums, l'activation ou la répression de l'expression des gènes de nodulation. Plusieurs études ont permis d'identifier ces gènes chez les rhizobiums. Les gènes de nodulation sont impliqués dans la biosynthèse de lipochitooligosaccharides (facteurs Nod), qui agissent comme molécules signal et induisent la formation des nodosités (Masson-Boivin et *al.*, 2009).

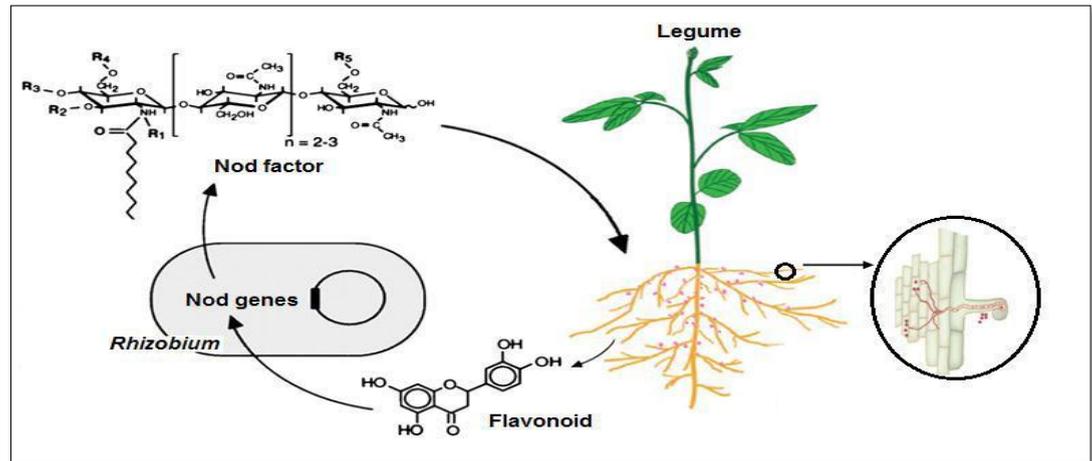


Figure 4: Echanges de signaux lors de la mise en place de la symbiose rhizobium/ légumineuse Nod-dépendant (d'après Lindstrom *et al.*, 2010)

Les flavonoïdes produits par la plante hôte induisent l'expression des gènes *nod* des rhizobiums, cela conduit à la production des facteurs Nod qui vont eux-mêmes en retour induire la réponse de la plante et l'initiation de la colonisation par la bactérie. Le zoom montre un cordon d'infection passant le cortex racinaire vers un groupe de cellules en division, qui deviendra le primordium nodulaire.

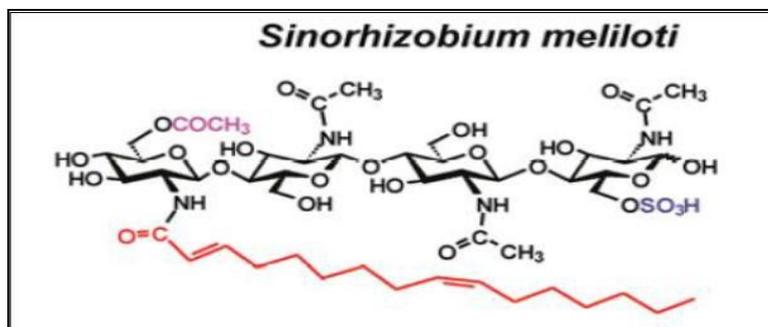
1.2.3.4. Processus de la nodulation

La nodulation se fait en plusieurs étapes, dont les plus importantes sont la pré infection, le développement du nodule et le cordon d'infection et enfin la formation des bactéroïdes.

a) Pré infection

Cette symbiose résulte d'un processus complexe, faisant intervenir une première étape, au cours de laquelle les deux organismes échangent des signaux moléculaires pour se reconnaître (Stacey *et al.* 2006). La plante produit au niveau de ses racines des composés (riches en flavonoïdes), qui sont perçus par les *Rhizobia* présents dans le sol. Ces composés vont déclencher la production bactérienne de signaux appelés facteurs Nod (pour Nodulation), ces derniers sont à leur tour reconnus par les poils absorbants des racines de la plante hôte, ce qui déclenche la formation d'un nouvel organe, le nodule, lieu de fixation de l'azote atmosphérique.

Les facteurs Nod sont les produits des gènes *Nod* des *Rhizobia*, ils assurent une structure de base spécifique (structure de nature lipo-chito-oligosaccharidique) (Dénarié et *al*, 1996). Chaque espèce de *Rhizobium* produit une structure des facteurs Nod qui lui sont propres, déterminant sa spécificité d'hôte et son activité biologique ; ainsi un nombre restreint de *Rhizobium* est capable de noduler un nombre restreint de légumineuses. Par exemple, la bactérie *Sinorhizobium meliloti* est capable de noduler spécifiquement la légumineuse *Medicago truncatula* grâce à la structure du facteur Nod qu'il produit (longueur de la chaîne lipidique, présence d'un groupement acétate et d'un groupement sulfate) (Gough et Cullimore, 2011).



- rouge la chaîne d'acide gras
- bleu le groupement sulfate
- rose le groupement acétate

Figure 5: Structure du facteur Nod produit par la bactérie *Sinorhizobium meliloti*, symbiote de la légumineuse *Medicago truncatula* (Gough et Cullimore, 2011).

b) Développement du nodule et le cordon d'infection

Les réponses cellulaires aux facteurs Nod sont les plus visibles, deux processus sont simultanément mis en place : le développement du nodule au niveau du cortex racinaire, et le développement d'un cordon d'infection depuis les poils absorbants jusqu'au nodule.

Les facteurs Nod sont perçus par les poils absorbants qui subissent une série de déformations avant de prendre la forme de crosse qui emprisonne les bactéries (Geurts et *al*, 2005). Au niveau de cette crosse se développe une structure en forme de tube, appelée cordon d'infection, qui progresse jusqu'au cortex interne de la racine. Simultanément à la mise en place de ce cordon, les cellules du cortex se divisent et forment un primordium nodulaire.

c) Formation des bactéroïde

Une fois toutes ces structures en place, les bactéries entrent dans la racine, cheminent le long du cordon d'infection jusqu'au niveau du primordium nodulaire, sont relarguées dans le cytoplasme des cellules du primordium où elles sont enfermées dans une structure appelée symbiosome. Au sein du symbiosome, les bactéries se différencient en bactéroïdes capables de fixer l'azote atmosphérique (Stracke et al, 2002).

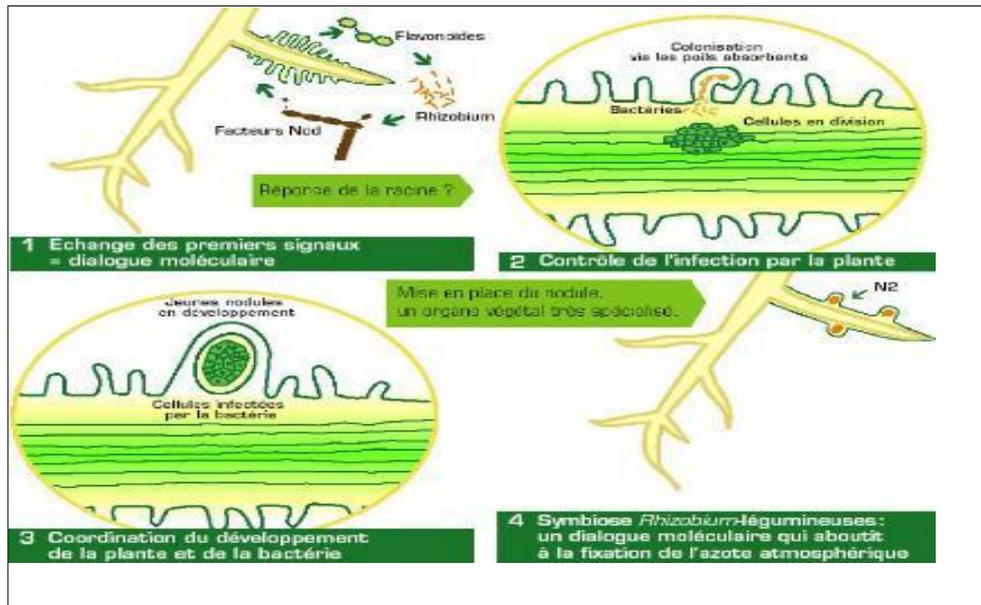


Figure 6: Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice de l'azote (Journet, 2004).



Figure 7: Nodules racinaire chez la légumineuse modèle *Medicago truncatula* (Gage, 2004).

2. POIS

2.1. Généralité sur le pois

De toutes les légumineuses, le pois (*Pisum sativum*) a la place la plus importante dans la biologie végétale et en particulier en génétique, en raison de travaux de Mendel (1866) (Smýkal et al, 2013). Actuellement le pois, est la deuxième légumineuse alimentaire la plus importante dans le monde entier après le haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.). La demande croissante de matières premières riches en protéines pour l'alimentation animale, ou des produits intermédiaires pour la nutrition humaine, ont conduit à un plus grand intérêt dans cette culture en tant que source de protéines (Gowhar et al, 2010), et sur une base mondiale, les légumineuses contribuent à environ un tiers de l'apport en protéines directe de l'humanité, tout en servant aussi une importante source de fourrage pour les animaux et d'huiles comestibles et industrielles.

Les pois ont une grande variété d'utilisations finales avec des feuilles, des gousses vertes, les graines immatures et graines mures sèches utilisées comme aliments pour animaux comprennent pâturage direct, le foin et l'ensilage. L'un des attributs les plus importants de légumineuses est leur capacité de fixation symbiotique de l'azote, ce qui souligne leur importance en tant que source d'azote dans les écosystèmes naturels et agricoles. Le pois, comme avec d'autres légumineuses, accumule aussi des produits naturels (métabolites secondaires), tels que les isoflavonoïdes qui sont considérés comme bénéfiques pour la santé humaine (anticancéreux et d'autres activités de promotion de la santé).

Le légume est d'une haute valeur nutritive; les graines de pois sont riches en protéines (23-25%), amidon lentement digestible (50%), les sucres solubles (5%), calories, vitamine A, C et Niacine, et éléments minéraux P, K, Ca, Mg et Fe. (Smýkal et al, 2013).

2.2. Importance économique

Au niveau mondial la culture du pois a une très grande importance économique, elle est cultivée principalement en Europe, Amérique du Nord,

Amérique du Sud, en Inde, et en Afrique (Sibylla , 2009).

D'après les données de la FAO (2013), le rendement mondial moyen du pois a été estimé à 1,72 tonnes/ha. Les principaux pays producteurs du pois frais et sec sont le Canada (35%), la Russie (12%), et la Chine (13%).

En Algérie, la culture du pois frais s'étend sur 32 641 hectares, avec une production de 127 680 tonnes. En Afrique du nord, l'Algérie est classée en troisième position de la production de pois après le Maroc et la Tunisie, dont les espèces de légumineuses alimentaires les plus cultivées sont la lentille, le pois chiche, la fève, le haricot et *Pisum sativum* (FAOSTAT, 2011).

2.3. Taxonomie

Le pois appartient à la famille botanique des légumineuses ou *papilionacées*, la troisième plus grande famille de plantes à fleurs (Smýkal et al, 2013). L'espèce *Pisum sativum* appartient au genre *Pisum*, classé dans la tribu des *Fabeae* (ou *Viciae*), qui regroupe diverses espèces de plantes herbacées annuelles, réparties en cinq genres : *Lathyrus* L. (gesse/pois doux, environ 160 espèces), *Lens* (lentilles, 4 espèces), *Pisum* L. (pois, 3 espèces), et *Vicia* L. (vesces, environ 140 espèces) et le genre monotypique *Vavilovia*. La classification la plus récente du genre *Pisum*, après avoir compté plusieurs espèces, regroupe trois espèces (Smýkal , 2011) :

- *P. sativum* L. Sub sp. *Sativum* (comprend var. *sativum* et var. *arvense*), et aussi *P. sativum* L. Sub sp. *elatius*
- *P. fulvum*
- *P. abyssinicum*

La classification des *Pisum* basée sur la morphologie et caryologie dont toutes les espèces sont vraies diploïde avec $2n = 14$ (Smýkal et al, 2013).

2.4. Biologie

La plante du pois est caractérisée par une croissance indéterminée (R. Cousin,1997). Elle a un système racinaire à pivot relativement peu développé et à racines secondaires, voire tertiaires ou quaternaires. La nodulation peut s'effectuer sur ces deux types de racines. L'appareil aérien est constitué d'une tige principale et des ramifications issues des bourgeons latéraux suite à une levée de dominance apicale, principalement sur les nœuds de la base de la tige principale. Les premiers nœuds sont exclusivement végétatifs, puis les suivants deviennent reproducteurs, chaque étage portant en position axillaire un nombre de fleurs variable, mais dont le nombre maximal est une caractéristique variétale (Boyeldieu, 1991).

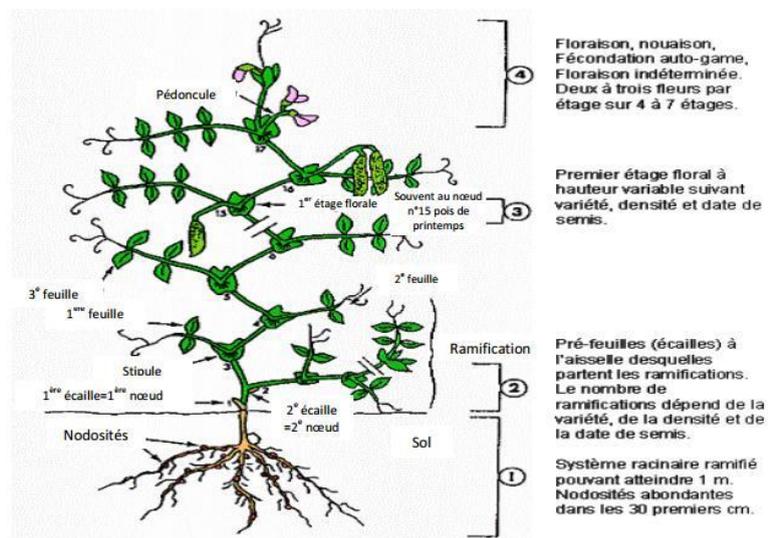


Figure 8: Structure d'une plante du pois (Boyeldieu, 1991)

2.5. Facteurs limitant la production

2.5.1. Stress abiotiques

Le froid, la sécheresse et les déficits nutritionnels sont les stress environnementaux les plus importants pouvant affecter la production de pois. L'aridité et les températures élevées apparaissent ensemble dans plusieurs régions de production de légumineuses, dont les deux types de stress peuvent interagir pour réduire les rendements (Cousin, 1997). De plus, la sécheresse peut arrêter la fixation de l'azote et diminuer la production de biomasse. En outre, la salinité est aussi un stress important du pois. Des

niveaux critiques du sel ont été établis, et des procédures de dépistage ont été élaborées pour identifier les déterminants génétiques de tolérance au sel chez le pois. La fixation de l'azote symbiotique est notamment sensible à la salinité élevée (Saxena , 1993).

2.5.2. Stress biotique

Le pois peut être affecté par des maladies cryptogamiques, bactériennes ou virales. Parmi les principales maladies ayant une incidence économique notables sur les cultures du pois nous pouvons citer:

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

- Diverses maladies virales, dont la jaunisse apicale du pois due au virus PTYV (*Pea Top Yellow Virus*) et la mosaïque commune du pois, due au virus PCMV (*Pea Common Mosaic Virus*).

- les maladies cryptogamiques affectant l'appareil végétatif: le mildiou du pois (*Peronospora pisi*), la pourriture grise (*Botrytis cinerea*), l'oïdium du pois (*Erysiphe pisi*), la sclérotinose (*Sclerotinia sclerotiorum*), la rouille (*Uromyces pisi*) et l'antracnose (*Colletrichum pisi*). (Paul , 1998)

- Les fontes des semis dues à différents champignons du sol notamment du genre *Pythium*. Les nécroses racinaires, dues entre autres à *Fusarium solani* et aux *Aphanomyces*, et la fusariose est une maladie vasculaire redoutable sur le pois, causée par *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisii* (Fop) (Kraft, 2001).

3. La fusariose vasculaire

La fusariose est une maladie causée par des champignons du genre *Fusarium* qui vivent dans le sol, et attaquent de nombreuses plantes (Amzelloug, 1999). Il existe plusieurs espèces recensées de ce champignon, à savoir *Fusarium oxysporum*. Ce dernier est un agent vasculaire qui se conserve dans le sol sous forme de chlamydospores, et infecte les plantes via les racines qu'elles

pénètrent soit directement soit par des blessures d'origine mécanique ou biologique (percées des racines secondaires, piqûres de nématodes,...).

Les maladies dues à l'espèce *F. oxysporum* sont largement répandues dans le monde, elles sont dommageables pour de nombreuses plantes (El Hadrami *et al.*, 1998).

3.1. *Fusarium oxysporum*

3.1.1. Généralité

En 1809, le genre *Fusarium* a été décrit pour la première fois par Link (Jeunot, 2005), il se compose de plusieurs espèces phytopathogènes responsables de maladies appelées « fusarioses » sur un grand nombre de plantes. L'origine du nom *Fusarium* provient du latin *Fusus*, car ses spores sont en formes de fuseau (Jeunot, 2005). Le genre *Fusarium* est caractérisé par de nombreuses espèces très variables au niveau morphologique, chacune d'elle étant représentée dans la nature par une majorité de souches saprophytes ou parasites de faiblesse, au sein desquelles peuvent se différencier des formes plus ou moins spécialisées douées d'une véritable pathogénicité (Feron, 1970).

Parmi le genre *Fusarium*, l'espèce *Fusarium oxysporum* est certainement le champignon tellurique le plus répandue dans la nature et dans tous les types de sols (Champion, 1997, Fravel *et al.*, 2002). Différentes souches de ce pathogène existent, celles qui envahissent le système vasculaire par les racines induisent une maladie de type systémique (Fravel *et al.*, 2002). Cette maladie vasculaire touche plusieurs espèces végétales, dont la culture de pois, et cela a été signalée dans tous les pays où cette culture est cultivée commercialement, elle est souvent sévère là où on pratique des rotations courtes avec d'autres cultures (Kraft, 1994).

3.1.2. Taxonomie

Selon Agrios (1998), la taxonomie de *Fusarium oxysporum* est comme suit:

Règne : Mycota

Division : Eumycota

Sub-division : Deuteromycota

Classe : Hyphomycota

Ordre : Hyphale

Famille : Tuberculariaceae

Genre : *Fusarium*

Espèce : *F. oxysporum*

3.1.3. Caractéristiques biologiques

Dans un milieu de culture solide, comme le milieu PDA, les différentes races de *F. oxysporum* f.sp. *pisi* peuvent varier d'apparence. Généralement, au début de la croissance, le mycélium aérien est blanc et peut ensuite virer vers d'autres couleurs (du violet jusqu'au pourpre foncé) selon la souche ou la forme spéciale (Smith *et al.*, 1988). Sa croissance est optimale à des températures qui varient entre 25° à 30°C (Kraft 1994).

Fusarium oxysporum produit trois types de spores asexuées: microconidies, macroconidies et chlamydospores.

Les microconidies sont uni- ou bicellulaires et sont produites abondamment et fréquemment par le champignon sous tout type de conditions. C'est aussi le type de spore qui est observé plus fréquemment à l'intérieur des vaisseaux des plantes infectées. Les microconidies de *F. oxysporum* ont souvent la forme d'une virgule ou sont ellipsoïdales (Agrios, 2005 ; Nelson *et al.*, 1983). Les macroconidies sont composées de trois jusqu'à cinq cellules, elles sont pointues et courbées jusqu'au bout. Ces spores peuvent être observés dans des sporodochiums à la surface des plantes qui ont été tués par le pathogène (Agrios, 2005; Nelson *et al.*, 1983; Schippers et van Eck, 1981).

Les chlamydospores sont des spores rondes d'une ou deux cellules, entourées d'une paroi épaisse plus ou moins pigmentée. Elles sont observées au milieu des hyphes ou en position terminale, souvent en forme de paires, quelques en triplets et rarement en forme rassemblée (Agrios, 2005; Nelson *et al.*, 1983).

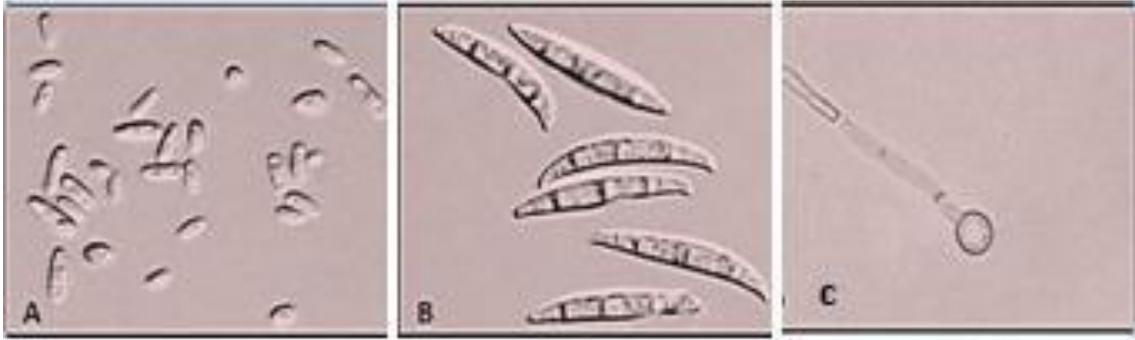


Figure 9: Représentation des formes de reproduction de *Fusarium oxysporum* ;
A : microconidies B: macroconidies; C : chlamydospore (Fourie et al ., 2011).

3.1.5. Cycle de vie

F. oxysporum possède un cycle à deux phases, une phase parasitaire et une phase saprophytique, qui peuvent se dérouler en quatre étapes : pénétration du pathogène dans la racine, propagation du pathogène à l'intérieur de la racine, propagation du pathogène dans la tige et reprise de la phase parasitaire (Figure 10).

3.1.5.1. Pénétration du pathogène dans la racine

Le plus souvent, le pathogène pénètre par les blessures naturelles, comme celles présentes au niveau du point d'émission des racines secondaires (Blancard, 1998). Cependant s'il y a une blessure, il s'avère selon Fernon (1970), que la position de la blessure sur la racine peut avoir une importance sur la pénétration de l'agent pathogène, et que l'invasion racinaire s'effectue par étapes successives suite à la compétition entre le champignon et le système de défense de la plante, les hyphes mycéliens se développent sur l'épiderme des racines pour commencer sa phase parasitaire. Le pathogène fixe son mycélium à la paroi végétale, et par formation d'appressorium, un filament mycélien plus fin va pouvoir percer la paroi végétale (Feron, 1970).

3.1.5.2. Propagation du pathogène à l'intérieur de la racine

Suite à la pénétration dans la paroi cellulaire, le mycélium se ramifie et colonise les cellules épidermiques voisines de façon intercellulaire. Une fois cette action réalisée, il y a colonisation du parenchyme cortical et de tout le cortex au niveau inter et intracellulaire. La colonisation du cortex provoque des brunissements sur les cellules touchées par l'agent pathogène, ce qui suggère la production de toxines par l'agent pathogène (Feron, 1970). En effet, deux toxines ont été identifiées, la lycomarasmine et l'acide fusarique (Darles, 2013). L'expansion mycélienne atteint ensuite les tissus du cylindre central, c'est ainsi que les vaisseaux sont colonisés. A partir des vaisseaux, l'agent pathogène progresse rapidement vers la tige.

3.1.5.3. Propagation du pathogène dans la tige

Dans les vaisseaux de la tige, le champignon produit des microconidies. Ces dernières sont transportées vers le haut et lorsqu'une paroi transversale empêche la progression, les microconidies germent. Le tube germinatif produit permet de passer dans la paroi et la formation de microconidies se réitère de l'autre côté de la paroi. Le champignon continue alors sa colonisation jusqu' à atteindre l'apex. Parfois, ce champignon produit des sporodochies qui contiennent des macroconidies. Après la mort de la plante, le mycélium se développe en dehors et démarre ainsi sa phase saprophyte. La production de micro et macroconidies à la surface de l'hôte constitue l'inoculum secondaire qui se dissémine par l'intermédiaire du vent, des eaux d'arrosages et l'utilisation d'outils (Iida, 2006 ; Darles, 2013). En outre, ce développement amorce la production de formes de conservation, les chlamydospores, pouvant persister plusieurs années dans le sol et être l'inoculum primaire lorsque les plantes hôtes appropriées sont plantées dans le sol (Iida, 2006).

3.1.5.4. Reprise de la phase parasitaire

Les chlamydospores permettent la reprise de la phase parasitaire en germant suite à la reconnaissance d'exsudats que produit la plante (Blancard, 1998). Le cycle peut ainsi recommencer.

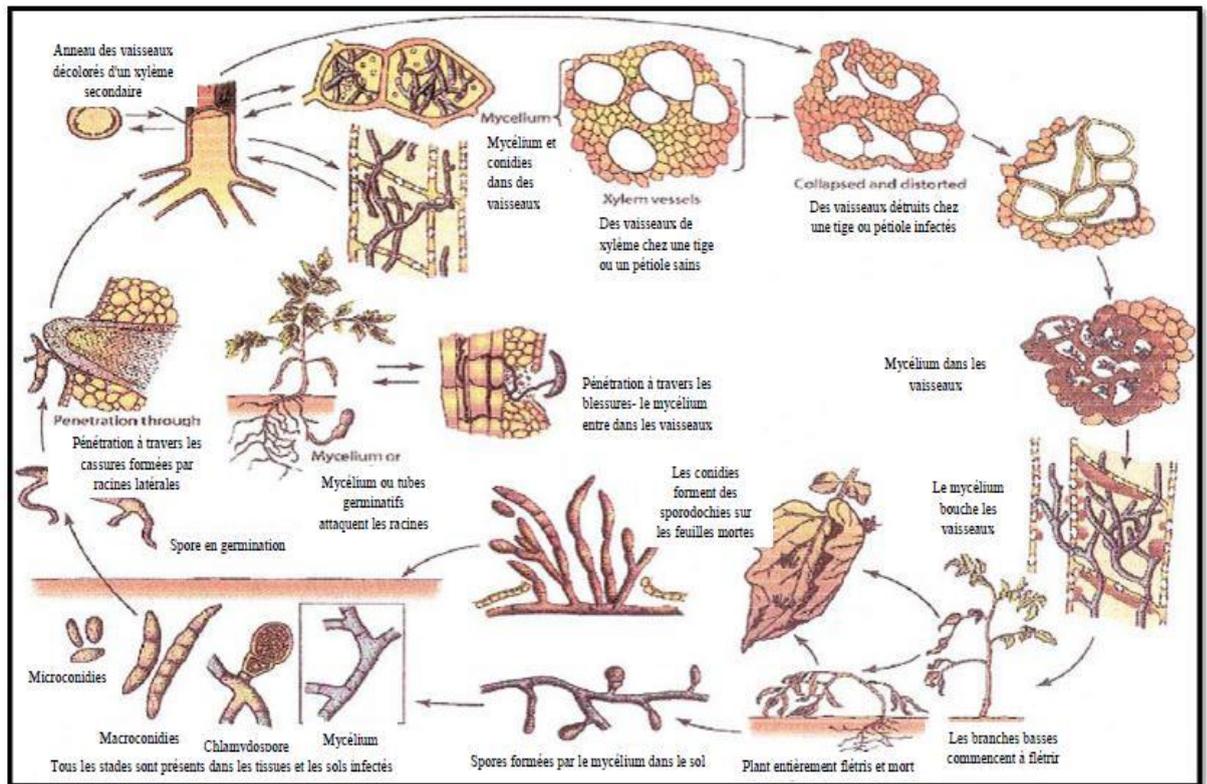


Figure 10 : Cycle infectieux de *Fusarium oxysporum* d'après Agrios, 2005.

3.1.6. Symptomatologie

Fusarium oxysporum f.sp. *pisi*, pénètre les racines de pois et infecte le système vasculaire à tout stade de croissance. Les plantes infectées montrent souvent une coloration rouge, orange ou sombre du tissu vasculaire de la racine et la partie inférieure de la tige. Les symptômes sur feuilles débutent par un jaunissement, puis elle se flétrit et se recourbent vers le bas au cours de la floraison, une infection précoce résulte souvent par la mortalité des plantules. L'incidence de la maladie peut varier selon les différentes races de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*, qui peut être réduite par une rotation de culture étendues et des semis précoces, mais la gestion la plus pratique et la plus rentable à ce jour est l'utilisation de cultivars résistants (Merzoug et al, 2014).



Figure 11 : symptômes de la fusariose vasculaire du pois.



Figure 12 : vue sur le terrain affecté par la fusariose.

(<http://agropedia.iitk.ac.in/sites/default/files/fusarium%20wilt1.jpg>)

3.1.4. Les races de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*

Fusarium oxysporum f.sp. *pisi* est connu pour sa variabilité pathogéniques. Onze races de l'agent pathogène ont été décrites, cependant, il n'y a que quatre races qui ont été décrites (Races : 1, 2, 5 et 6). Des désaccords considérables existent sur la classification des races.

Les races 1 et 2 ont été rencontrées dans le monde entier, elles peuvent être considérées, de point de vue perte économique, les plus importantes dans la plupart des zones de culture de pois. Tandis que les races 5 et 6 ont été observées uniquement dans l'Etat de Washington (Merzoug et al, 2014).

4. Moyen de lutte

Parmi les méthodes de lutte contre la fusariose vasculaire du pois (culturale, génétique, chimique et biologique), celle qui reste performante à ce jour est l'utilisation des variétés résistantes (Bani, 2015, Guimaraes et al, 2007). Mais durant ces dernières années, le contrôle biologique de la fusariose vasculaire a donné des résultats encourageants.

Lutte génétique: La résistance génétique aux races 1, 2, 5, et 6 de Fop se rapporte à un seul gène dominant (Kraft et Pflieger, 2001, Coyne et al, 2000). La résistance à la race 1 est contrôlée par le gène '**Fw**' (Bani, 2015, Grajal-Martin, et Muehlbauer, 2002,) la résistance à la race 2 est contrôlée par le gène '**FWN**' (Kraft et Pflieger, 2001, Grajal-Martin et Muehlbauer, 2002), mais il a été démontré que plusieurs gènes

pourraient être impliquées dans cette résistance (Infantino, 2006, Bani, 2015). Bien que les loci de résistance aient été introduit dans les cultivars de grand intérêt agronomique, cette résistance n'est pas toujours complète. Par conséquent lorsque la sévérité de la maladie est importante, les cultivars sont tués causant aussi une perte de rendement très importante (Kraft et Pflieger, 2001, Hagedorn, 1984).

Lutte culturale: Pour compléter la résistance génétique, la rotation de cultures est une bonne pratique qui contribue à réduire les dégâts provoqué par l'agent pathogène. Cependant, la rotation de culture n'a pas des effets minimes sur la réduction de la maladie, non seulement parce que les chlamydospores de Fop ont une durée de survie très longue, mais aussi parce que l'inoculum peut se multiplier sur les racines des plantes infectées et des plante non-hotes. Néanmoins, une rotation de cinq ans peut aider à prévenir la fusariose vasculaire du pois (Biddle, et Cattin , 2007).

Lutte chimique: Face à une maladie vasculaire, l'utilisation de fongicides à action systémique est envisageable (Bounaga, 1985). Cependant, la réparation des chlamydospores à des grandes profondeurs et sur de vastes étendus, ainsi que le cout élevé des opérations de lutte, font que toute tentative de traitement chimique est vouée à priori à l'échec. Le traitement chimique est considéré comme une solution de facilité, contrairement à la lutte biologique qui demande davantage de connaissance et d'observation, mais à long terme, elle est plus intéressante (Corbaz, 1990).

Lutte biologique: La lutte biologique vis-à-vis le fusariose vasculaire, pourrait être réalisée par l'application de certaines souches de *Pseudomonas spp.fluorescens* ou de souches non pathogènes de *F. oxysporum*, *Trichoderma spp* et *Gliocladium spp* (Sakthivel, N., et Gnanamanickam, S.S., 1989). Bien que prometteuse, jusqu'à présent aucun de ces organismes n'a été utilisé pour lutter contre la fusariose officiellement. (Kraft, et Pflieger, 2001, Bani, 2015, Defago, et Haas, 1990). Les souches de *rhizobia* à la capacité de fixer l'azote atmosphérique, et de solubiliser le phosphore et à limiter la croissance de certains champignons phytopathogènes du sol (*Rhizoctonia solani* et *Fusarium culmorum*) (Glick et al, 2007).

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

1. Matériels Biologique

1.1 Matériels végétales

L'essai d'antagonisme *in situ* a été mené sur cinq géotypes de pois (*Pisum sativum*) : quatre géotypes sélectionnés en Espagne, en plus d'un géotype cultivé localement en Algérie.

Tableau 2: Géotypes étudiés

Origine	Code	Etat
Géotypes Espagnoles	J11412	Résistant
	Messire	Partiellement résistant
	J11210	Sensible
	P21	Sensible
Géotype local	Kelvedone Wonder Peas	Résistant

1.2 Isolats fongiques phytopathogènes

Pour réaliser notre travail expérimental, nous avons utilisé deux races de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* (Fop): Fop R1 (race 1) et Fop R2F42 (race 2), d'origine espagnole (Institut de l'agriculture durable IAS-CSIC Cordoue, Espagne) (Figure13).

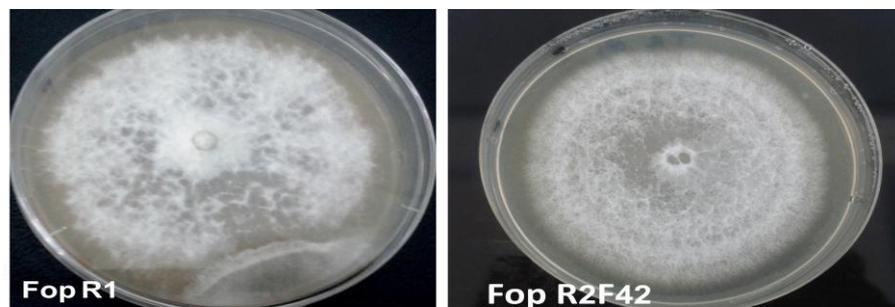


Figure 13: les deux souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* utilisées

1.3 Isolats bactériens

Nous avons utilisé dans notre travail expérimental, quatre souches de *Rhizobiaceae* (Institut de l'agriculture durable IAS-CSIC Cordoue, Espagne) et une souche de *Pseudomonas fluorescens* (Laboratoire de phytopathologie de l'université de Blida, Algérie), à fin d'étudier leurs activités et propriétés antagonistes *in situ* et *in vitro* vis-à-vis de la fusariose vasculaire du pois.

Tableau 3: Les souches bactériennes

<i>Rhizobium sp</i>	<i>Mesorhizobium loti</i> .
	<i>Sinorhizobium meliloti</i> .
	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> .
	Mutant <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> .
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	F21.

2. Antagonisme *in situ*

Les essais d'antagonisme *in situ* ont été effectués avec les cinq souches bactériennes (Tableau 3), vis-à-vis des deux souches de *Fop* (R1 et R2F42). Ces essais ont été réalisés sous serre en verre en interaction avec les cinq génotypes de pois (Tableau 2).

2.1 Désinfection des semences

Les graines de pois sont désinfectées par trempage, dans l'hypochlorite de sodium à 1% pendant 30 minutes à température ambiante, suivi de deux rinçages à l'eau distillée stérile durant 20 minutes pour chaque rinçage. Dans des conditions d'asepsie, ces graines sont mises dans des boîtes Pétri en verre stériles, tapissées de papier filtre stérile imbibé d'eau, puis les boîtes sont recouvertes avec du papier aluminium pour les abriter de la lumière.

Ces dernières sont placées à 4°C (réfrigérateur) pendant 2 jour pour stratifier les graines et synchroniser la germination, qui seront placées par la suite à une température d'environ 20 °C pendant 4 jours. Une fois germées, les graines sont transférées dans des pots de Perlite stérile. Les plantules sont arrosées avec de l'eau courante selon le besoin.

2.2 Préparation d'inoculum

2.2.1 Inoculum fongiques

Les suspensions conidiennes de *Fop* ont été obtenues à partir des cultures pures des deux souches de *Fop* (R1, R2F42), cultivées sur milieu PDA pendant sept jours. Ces suspensions conidiennes ont été préparées à partir des disques mycéliens homogénéisés dans des flacons de milieu PD liquide. Les flacons sont mis sous agitation constante (environ 170rpm) à température ambiante pendant 10 jours, et l'inoculum est ensuite filtré à l'aide des compresses stériles. La concentration de la suspension conidienne a été ajustée approximativement 5×10^6 conidies/ml à l'aide d'une cellule de Malassez.

2.2.2 Inoculum bactériens

➤ *Pseudomonas fluorescens F21*

L'inoculum bactérien de *Pseudomonas fluorescens* a été préparé avec la crème bactérienne âgée de 24h, cultivé sur milieu KB, incubé à 25°C dans l'étuve pendant 5-7 jours, ensuite les colonies bactériennes sont raclées etensemencées dans un milieu de culture de KB liquide, qui est incubé à 28°C dans l'étuve pendant 7 jours. La densité optique a été estimée à D.O $\approx 0,8$, soit l'équivalent de 10^6 CFU/ml.

➤ *Rhizobium spp.*

L'inoculum bactérien de *Rhizobium spp.* a été préparé avec une suspension bactérienne conservée dans du glycérol, cultivé par la suite sur milieu YMA, incubé à 30°C dans l'étuve pendant 5-7 jours, ensuite les colonies bactériennes sont raclées etensemencées dans un milieu de culture de YM liquide, qui est incubé à 28°C dans l'étuve pendant 7 jours. La densité optique a été estimée à D.O $\approx 0,8$, soit l'équivalent de 10^6 CFU/l.

2.3 Inoculation des plantes

Au stade de deux à trois nœuds (Figure14), nous avons pratiqué la bactérisation des plantes sur un lit de tourbe avec chacune des cinq souches bactériennes(Figure15), suivi 24h après par une inoculation fongique, qui s'est

effectuée par immersion des racines durant 5 min (Figure16), après avoir coupé 1/3 de celles-ci, selon la méthode « trimmed root dipping ». Les témoins négatifs (T-) sont inoculés uniquement avec de l'eau distillée stérile et les plantes du témoin positif (T+) sont inoculées avec chacune des suspensions conidiennes (Fop R1 et Fop R2).



Figure 14: Stade de deux à trois nœuds



Figure 15: Inoculation bactérienne



Figure 16: Inoculation fongique.

2.4 Dispositif expérimental

Les essais expérimentaux *in situ* ont été réalisés selon un dispositif composé de deux blocs aléatoires complets. Les deux blocs contiennent 450 traitements (90 traitements X 5 répétitions) :

Un bloc renferme 270 traitements (18 inoculations X 5 géotypes X 3 répétitions) et un autre bloc renferme 180 traitement (18 inoculations X 5 géotypes X 2 répétitions) (Tableau 4, et Figure17).



Figure 17: Dispositif expérimental

Tableau 4: Traitements étudiées

Inoculation / Géotypes	EDS	Fop R1	Fop R2F42	Pf F21	Meso loti	Sino	RL	Mutant R.L	R1* F21	R1 Meso	R1 Sino	R1 R.L	R1 Mutant	R2 F21	R2 Meso	R2 Sino	R2 RL	R2 Mutant
Jl1412	T1	T6	T11	T16	T21	T26	T31	T36	T41	T46	T51	T56	T61	T66	T71	T76	T81	T86
Messire	T2	T7	T12	T17	T22	T27	T32	T37	T42	T47	T52	T57	T62	T67	T72	T77	T82	T87
Jl1210	T3	T8	T13	T18	T23	T28	T33	T38	T43	T48	T53	T58	T63	T68	T73	T78	T83	T88
P21	T4	T9	T14	T19	T24	T29	T34	T39	T44	T49	T54	T59	T64	T69	T74	T79	T84	T89
Kelvedone	T5	T10	T15	T20	T25	T30	T35	T40	T45	T50	T55	T60	T65	T70	T75	T80	T85	T90

EDS: Eau distillé stérile.

Fop R1: *Fusarium oxysporum* f sp *pisii*: Fop R1 (race 1) et Fop R2F42 (race 2).

Pf F21: *Pseudomonas fluorescens* F21.

Meso loti: *Mesorhizobium loti*.

Sino: *Sinorhizobium meliloti*.

RL: *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*.

Mutant RL: *Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*.

2.5 Paramètres étudiés

Pour le suivi du déclenchement et de l'évolution de la fusariose vasculaire du pois, trois principaux paramètres ont été pris en considération: le taux d'infection, la sévérité de la maladie et l'évaluation de l'AUDPC.

L'évaluation des symptômes caractéristiques de la fusariose vasculaire du pois, s'est effectuée tous les trois jours à partir du septième jour après l'inoculation jusqu'au 31 jours. Pour cela, le taux d'infection et la sévérité de la maladie seront mesurés, ce qui servira pour calculer l'AUDPC (Area Under the disease progress curve) à la fin de l'expérience.

Pour le suivi du développement de la maladie, nous avons utilisé une échelle de cinq degrés différentiels représentant les symptômes typiques de la fusariose vasculaire (Bani, 2015 ; Yala, 2016):

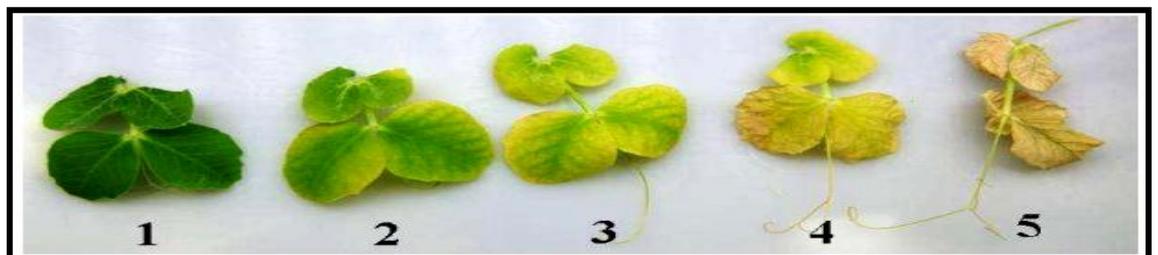


Figure 18: Echelle de l'évaluation des symptômes de la fusariose vasculaire

- (1) feuille verte saine ; (2) initiation d'un jaunissement et d'un flétrissement ou d'un enroulement de la feuille ;
- (3) jaunissement ou flétrissement de plus de 50% de la feuille ; (4) jaunissement ou flétrissement complet de la feuille ;
- (5) feuille morte.

❖ Taux d'infection

Le taux d'infection ou incidence de la maladie, sera évalué au jour 31 après infection, en calculant le pourcentage de plantes mortes (ou porteuse de symptôme évident) sur le nombre de plante totale pour chaque génotype.

$$I\% = (\text{nombre de feuilles infectées} / \text{nombre total de feuilles}) \times 100$$

❖ Sévérité de la maladie

$$S\% = \text{Taux de sévérité} = \frac{(1 \times f1) + (2 \times f2) + (3 \times f3) + (4 \times f4) + (5 \times f5)}{f}$$

f1 : nombre de feuilles présentant le niveau 1

f2 : nombre de feuilles présentant le niveau 2

f3 : nombre de feuilles présentant le niveau 3

f4 : nombre de feuilles présentant le niveau 4

f5 : nombre de feuilles présentant le niveau 5

f : nombre total de feuilles

❖ AUDPC (Area Under the disease progress curve)

Ce paramètre permettra d'évaluer la progression de la maladie durant la période d'expérimentation, c'est-à-dire le temps de suivi et de déroulement de l'expérimentation.

$$AUDPC = \sum [(X_i + X_{i+1})/2] * (t_{i+1} - t)$$

X_i : Sévérité de la maladie au temps i ,

X_{i+1} : Sévérité de la maladie au temps $i+1$,

$t_{i+1} - t$: Nombre de jour entre temps i et $i + 1$

2.6 Effet de nodulation

A la fin de l'expérimentation sous serre nous allons peser et mesurer les nodules des traitements bactérisés avec les *Rhizobiaceae* en présence et en absence de l'agent pathogène, à fin de comparer l'effet de fusariose sur la nodulation.

3. Antagonisme in vitro

Les tests d'antagonisme *in vitro* ont été effectués avec quatre souches bactériennes de *Rhizobium* sp, et une souche de *P.fluorescens* (Tableau 4), face à deux souches de Fop (R1 et R2F42), agent causal de la fusariose vasculaire du pois. Ces tests concernent l'inhibition de la croissance mycélienne.

Le test de l'activité inhibitrice des cinq souches bactériennes, sur la croissance mycélienne des deux souches de Fop a été réalisé en quatre

répétitions. Pour la comparaison, nous avons utilisé les cultures fongiques seules. Les milieux gélosés utilisés sont :

- Le milieu KB, favorable au développement des *P. fluorescens* F21.
- Le milieu YMA, favorable au développement des *Rhizobiaceae*.
- Le milieu PDA, favorable au développement des champignons.
- Le milieu mixte1 (50% KB + 50% PDA).
- Le milieu mixte2 (50% YMA +50% PDA).

L'évaluation de l'action inhibitrice a été testée selon la méthode des spots (Chet, I, 1987) (Figure), qui consiste à mettre en contact des disques de papier Wathman stérile de 0.5 cm de diamètre, imprégnés de suspension bactérienne, puis à l'aide d'une pince stérile les disques sont mis sur la surface des milieux gélosés à la périphérie de la boîte de Pétrie (KB, YMA, PDA, le milieu mixte1 et le milieu mixte2), et au centre de chaque boîte nous déposons un disque mycélien de 0.5 cm de diamètre de l'isolat cryptogamique cultivé préalablement sur le milieu gélosé.

Le taux d'inhibition est calculé après 7 jours d'incubation à 25 °C, relativement à la croissance mycélienne maximale enregistrée chez les témoins qui sont représentés par les cultures cryptogamiques pures sans interaction avec les souches

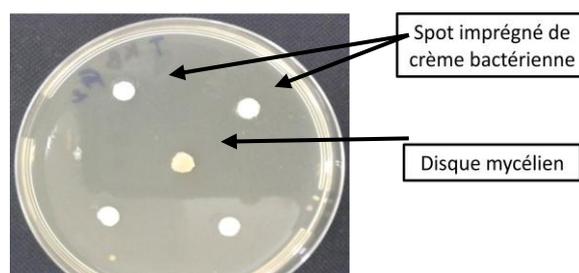


Figure 19: La méthode des spots

4. Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats a été basée sur l'analyse de la variance enregistrée dans les traitements. Dans le cas de différences significatives, la comparaison des traitements est établie par le test Newman-Keuls au seuil de risque d'erreur de 5% à fin de déterminer leurs amplitudes significatives.

Chapitre 3

Résultats et Discussions

1. Résultats d'antagonismes *in situ*

L'étude de l'antagonismes *in situ* sous serre, a permis l'obtention des résultats avec les variables étudiés à savoir : le taux d'infection, la sévérité de la maladie et l'AUDPC. Concernant le paramètre de nodulation, il n'a pas pu être pris en considération vu l'effet de nodulation négatif.

1.1 Taux d'infection des géotypes étudiés

D'après les résultats, nous constatons que l'évolution du taux d'infection des cinq géotype du pois, montre un net recul de la maladie des traitements bactérisés, avec les cinq souche *Pseudomonas fluorescens*, *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, et *Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, par rapport aux témoins positifs (Fop R1 et Fop R2F42).

Géotype JI1412 : Avec la souche pathogène Fop R1, le taux d'infection a marqué une stagnation aux seuils de 29.92% avec la souche *Pseudomonas fluorescens*, de 40.28% avec *Mesorhizobium loti*, de 47.22% avec *Sinorhizobium meliloti*, de 47.76% avec *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, et de 43.59% avec *Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *Viceae*, alors que l'infection débute avec des taux allant de 8.57% (*Sinorhizobium meliloti*) à 32.50% (*Mesorhizobium loti*). Avec la souche FopR2F42, les taux d'infection ont marqué des stagnations allant de 57.07% (*Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*) à 57.69% (*Pseudomonas fluorescens*), en débutant par des niveaux allant de 12.14% (*Pseudomonas fluorescens*) à 21.43% (*Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*). Chez les témoins positifs, l'évolution de l'indice d'infection a été brusque et rapide, en commençant par des indices allant de 26.79% (Fop R2F42) et de 40,18% (Fop R1), pour atteindre des maximums de 56.44% (Fop R2F42) et de 52.78% (Fop R1).

Tableau 5: Taux d'infection (%) de géotypes JI1412.

Jours / Traitements	7	10	13	16	19	22	25	28	31
EDS	14,29	26,79	29,17	29,00	30,36	39,33	54,66	57,27	57,27
FopR1	40,18	42,22	47,32	47,22	47,73	47,73	50,51	50,51	52,78
FopR2F42	26,79	28,57	29,17	28,18	34,72	37,73	54,55	56,44	56,44
FopR1XF21	20,20	22,11	22,50	23,61	25,40	26,79	29,17	29,92	29,92
FopR1XMeso	32,50	38,75	33,33	26,67	36,51	25,00	34,72	34,72	40,28
FopR1XSlino	8,57	8,33	25,63	33,33	35,71	33,93	37,50	47,22	47,22
FopR1XRL	20,54	28,57	27,78	27,78	33,18	35,76	47,73	47,76	47,76
FopR1XRL Mut	20,20	20,54	22,22	26,67	26,11	23,64	27,27	43,59	43,59
FopR2XF21	12,14	14,58	14,58	16,25	15,80	33,45	33,42	57,69	57,69
FopR2XMeso	20,54	26,79	27,78	31,67	33,86	30,00	45,45	51,79	51,79
FopR2XSlino	12,50	39,29	56,25	47,92	44,63	52,78	59,24	71,58	71,58
FopR2XRL	33,04	40,75	38,89	36,67	40,00	39,39	50,56	63,89	63,89
FopR2XRL Mut	21,43	28,57	33,93	29,86	33,91	35,45	45,45	57,07	57,07

Génotype Messire : Avec la souche pathogène *Fop* R1, le taux d'infection a marqué une stagnation aux seuils de 47.22% avec la souche *Pseudomonas fluorescens*, de 69.70% avec *Mesorhizobium loti*, de 100% avec *Sinorhizobium meliloti*, de 77.50% avec *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, et de 45.83% avec *Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *Viceae*, alors que l'infection débute avec des taux allant de 9.38% (*Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*) à 16.67% (*Sinorhizobium meliloti*). Avec la souche *Fop*R2F42, les taux d'infection ont marqué des stagnations allant de 82.62% (*Pseudomonas fluorescens*) à 100% (*Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*), en débutant par des niveaux allant de 8.33% (*Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*) à 15.48% (*Pseudomonas fluorescens*). Chez les témoins positifs, l'évolution de l'indice d'infection a été brusque et rapide, en commençant par des indices allant de 44.51% (*Fop* R1) et de 22.62% (*Fop* R2F42), pour atteindre des maximums de 83.33% (*Fop* R1) et de 100% (*Fop* R2F42) durant les dernières observations.

Tableau 6: Taux d'infection (%) de géotypes Messire.

Jours/ Traitements	7	10	13	16	19	22	25	28	31
EDS	12,50	23,61	30,1	54,45	70,95	82,00	89,29	100,00	100,00
FopR1	44,51	50,00	51,67	53,75	53,57	47,22	59,03	83,33	83,33
FopR2F42	22,62	22,62	33,33	55,95	83,33	87,50	100,00	100,00	100,00
FopR1X F21	10,00	22,62	19,64	20,83	23,61	29,17	40,97	47,22	47,22
FopR1XMeso	14,29	18,75	16,67	21,25	15,56	35,00	55,00	69,70	69,70
FopR1XSino	16,67	30,95	30,95	92,86	85,71	100,00	100,00	100,00	100,00
FopR1XRL	14,29	26,79	18,75	17,36	15,56	30,30	62,27	77,50	77,50
FopR1XRL Mut	9,38	10,00	8,33	4,86	14,91	47,25	76,92	45,83	45,83
FopR2XF21	15,48	21,43	20,54	18,75	35,24	47,78	56,67	82,62	82,62
FopR2XMeso	25,00	25,89	54,86	44,44	56,25	47,22	48,61	90,00	90,00
FopR2XSino	10,00	40,00	91,67	91,67	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
FopR2XRL	8,33	21,43	7,14	19,64	57,67	86,67	93,33	96,30	96,30
FopR2XRL Mut	8,33	18,33	38,39	35,71	80,95	85,71	100,00	100,00	100,00

Géotype JI1210 : Avec la souche pathogène *Fop R1*, le taux d'infection a marqué une stagnation aux seuils de 42.22% avec la souche *Pseudomonas fluorescens*, de 50% avec *Mesorhizobium loti*, de 100% avec *Sinorhizobium meliloti*, de 61.43% avec *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, et de 46.67% avec *Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *Viceae*, alors que l'infection débute avec des taux allant de 3.70% (*Mesorhizobium loti*) à 34.29% (*Sinorhizobium meliloti*). Avec la souche *FopR2F42*, les taux d'infection ont marqué des stagnations allant de 56.11% (*Pseudomonas fluorescens*) à 100% (*Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*), en débutant par des niveaux allant de 14.29% (*Pseudomonas fluorescens*) à 16.67% (*Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*). Chez les témoins positifs, l'évolution de l'indice d'infection a été brusque et rapide, en commençant par des indices allant de 0% (*Fop R1*) et de 24.29% (*Fop R2F42*), pour atteindre des maximums de 61.25% (*Fop R1*) et de 100% (*Fop R2F42*) durant les dernières observations.

Tableau 7: Taux d'infection (%) de génotypes JI1210.

Jours/ Traitement	7	10	13	16	19	22	25	28	31
EDS	25	40,00	48,33	73,21	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
FopR1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	12,50	16,67	61,25	61,25
FopR2F42	24,29	26,67	41,43	81,67	92,86	100,00	100,00	100,00	100,00
FopR1XF21	12,50	14,29	22,50	23,81	35,00	38,10	38,64	41,67	47,22
FopR1XMeso	3,70	5,56	6,25	7,14	16,25	25,89	28,75	50,00	50,00
FopR1XSino	34,29	43,75	45,00	55,56	83,33	100,00	100,00	100,00	100,00
FopR1XRL	6,25	7,14	8,33	11,11	11,11	22,22	40,00	61,43	61,43
FopR1XRL Mut	7,14	8,33	17,14	20,83	39,29	39,29	44,44	46,10	46,67
FopR2XF21	14,29	17,14	20,50	50,89	17,57	37,14	53,21	56,11	56,11
FopR2XMeso	21,43	47,22	78,57	66,67	100,00	100,00	95,83	100,00	100,00
FopR2XSino	16,67	29,17	58,57	62,50	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
FopR2XRL	6,25	7,14	12,50	53,57	83,33	94,44	100,00	100,00	100,00
FopR2XRL Mut	16,67	23,81	69,05	91,67	92,59	100,00	100,00	100,00	100,00

Génotype P21 : Avec la souche pathogène *Fop R1*, le taux d'infection a marqué une stagnation aux seuils de 80.78% avec la souche *Pseudomonas fluorescens*, de 85.44% avec *Mesorhizobium loti*, de 100% avec *Sinorhizobium meliloti*, de 80% avec *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, et de 75.13% avec *Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *Viceae*, alors que l'infection débute avec des taux allant de 6.25% (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*) à 25% (*Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*). Avec la souche *FopR2F42*, les taux d'infection ont marqué des stagnations de 100% avec toutes les souches (*Pseudomonas fluorescens*, *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, *Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* Mut), en débutant par des niveaux allant de 15% (*Pseudomonas fluorescens*) à 40.40% (*Mut Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*). Chez les témoins positifs, l'évolution de l'indice d'infection a été brusque et rapide, en commençant par des indices allant de 18.06% (*Fop R1*) et de 55.05% (*Fop R2F42*) dès les premières observations, pour atteindre des maximums de 95.83% (*Fop R1*) et de 100% (*Fop R2F42*) durant les dernières observations.

Tableau 8: Taux d'infection (%) de géotypes P21.

Jours/ Traitement	7	10	13	16	19	22	25	28	31
EDS	32,36	61,82	72,73	79,37	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
FopR1	18,06	22,50	27,84	31,25	36,93	41,67	60,42	95,83	95,83
FopR2F42	55,05	57,78	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
FopR1XF21	15,83	17,07	19,09	22,50	31,49	40,63	53,13	80,78	80,78
FopR1XMeso	9,55	11,86	16,08	16,25	25,55	42,86	60,71	85,44	85,44
FopR1XSino	7,14	42,86	75,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
FopR1XRL	6,25	20,00	26,52	26,67	51,65	55,77	73,90	80,00	80,00
FopR1XRL Mut	25,00	28,64	48,11	44,23	53,57	60,77	70,09	75,13	75,13
FopR2XF21	15,00	15,00	18,64	36,36	80,00	92,73	100,00	100,00	100,00
FopR2XMeso	38,75	60,00	83,33	84,44	90,91	90,91	100,00	100,00	100,00
FopR2XSino	33,04	62,50	93,75	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
FopR2XRL	27,50	62,78	94,44	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
FopR2XRL Mut	40,40	61,36	68,69	81,25	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Géotype Kelvedon Wonder Peas : Avec la souche pathogène *Fop R1*, le taux d'infection a marqué une stagnation aux seuils de 62.50% avec la souche *Pseudomonas fluorescens*, de 78.57% avec *Mesorhizobium loti*, de 100% avec *Sinorhizobium meliloti*, de 50% avec *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, et de 71.43% avec *Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *Viceae*, alors que l'infection débute avec des taux allant de 5.56% (*Pseudomonas fluorescens*) à 45% (*Mesorhizobium loti*). Avec la souche *FopR2F42*, les taux d'infection ont marqué des stagnations aux seuils de 100% avec toutes les souches (*Pseudomonas fluorescens*, *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, *Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*), en débutant par des niveaux allant de 0% (*Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*) à 50% (*Mesorhizobium loti*),. Chez les témoins positifs, l'évolution de l'indice d'infection a été brusque et rapide, en commençant par des indices allant de 21.43% (*Fop R1*) à 41.67% (*Fop R2F42*) dès les premières observations, pour atteindre des maximums de 100% (*Fop R1*, et *Fop R2F42*) durant les dernières observations.

Tableau 9: Taux d'infection (%) de géotypes Kelvedon Wonder Peas.

Jours/ Traitement	7	10	13	16	19	22	25	28	31
EDS	20,00	20,00	20,00	20,00	60,00	80,00	100,00	100,00	100,00
FopR1	21,43	31,43	30,56	31,43	30,56	32,22	44,44	100,00	100,00
FopR2F42	41,67	45,00	50,00	50,00	63,33	65,00	81,67	100,00	100,00
FopR1XF21	5,56	6,25	6,25	7,14	22,50	24,75	62,50	62,50	62,50
FopR1XMeso	45,00	50,00	75,00	66,67	66,67	78,57	78,57	78,57	78,57
FopR1XSino	8,33	16,67	36,67	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
FopR1XRL	7,14	8,33	8,33	8,33	8,33	8,33	25,00	50,00	50,00
FopR1XRL Mut	6,19	10,00	10,00	24,16	26,21	37,21	38,05	71,43	71,43
FopR2XF21	10,00	23,81	27,14	37,14	73,81	73,10	100,00	100,00	100,00
FopR2XMeso	50,00	66,67	71,43	69,05	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
FopR2XSino	27,08	43,75	50,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
FopR2XRL	18,33	30,00	45,00	50,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
FopR2XRL Mut	0,00	0,00	0,00	10,00	16,67	70,00	100,00	100,00	100,00

1.2 Sévérité de la maladie

D'après les résultats obtenus, nous remarquons qu'il existe une correspondance entre le taux d'infection et la sévérité. Nous constatons que la bactérisation des cinq géotypes de pois avec les cinq souches bactériennes, en interaction avec les deux souche de *Fop*, a permis de réduire la sévérité de la maladie en comparaison avec les témoins positifs (FopR1 et FopR2F42) (Tableau 10, Figure 20,21).

Chez les témoins sains (EDS), les niveaux de sévérité lors des premières observations (7 jours), sont en moyenne de 1 à 2. Leur évolution reste lente et atteint en moyenne le niveau 4 au 31jours, due principalement aux anomalies physiologiques (Tableau 10).

Pour les témoins malades, les niveaux vont de 1 à 3 dès les premières observations, leur évolution est plus dynamique, atteignant souvent des valeurs supérieures au niveau 3 pour atteindre facilement le niveau maximal durant les dernières observations (Tableau 10).

L'application de la bactérisation à la base des cinq souches, nous permettent de constater qu'il y a des symptômes préliminaires de niveau de 1 à 2, leur évolution reste lente et globalement similaires à ceux observés chez les témoins sains, qui sont plus dues aux anomalies physiologique que malades (Tableau 11).

Tableau 10: Sévérité des symptômes des géotypes étudiés non bactérisés.

Traitements	Géotype	Jours								
		7	10	13	16	19	22	25	28	31
Eau Distillé Stérile	Jl1214	1,44	1,57	1,86	1,84	1,99	1,94	2,15	2,32	2,32
	Messire	1,51	2,04	1,73	1,87	2,40	2,84	2,52	5,00	5,00
	Jl1210	1,4	2,07	2,33	3,17	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
	P21	1,41	1,84	3,01	4,14	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
	Kelvedon	1,30	1,50	1,60	1,60	2,80	3,38	4,40	4,40	4,40
Fop R1	Jl1214	1,78	2,39	2,52	4,52	2,53	2,55	2,62	2,88	2,88
	Messire	2,02	3,50	3,51	3,28	3,40	3,46	3,53	4,00	4,00
	Jl1210	1,00	1,13	1,13	1,13	1,15	1,15	1,17	2,13	2,13
	P21	1,43	1,62	1,92	2,06	2,51	2,54	2,89	3,48	3,48
	Kelvedon	1,44	1,70	1,93	1,97	2,17	2,17	2,26	3,30	3,30
Fop R2F42	Jl1214	1,19	1,76	1,92	2,02	2,05	2,17	2,28	2,53	2,53
	Messire	1,76	1,76	2,07	2,25	3,61	3,98	4,53	5,00	5,00
	Jl1210	1,17	1,34	2,00	2,88	4,03	5,00	5,00	5,00	5,00
	P21	1,88	1,97	4,15	4,70	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
	Kelvedon	1,60	2,00	2,00	2,50	3,00	3,22	3,62	4,46	4,46

Tableau 11: Sévérité des symptômes des géotypes étudiés bactérisés en interaction avec Fop R1.

Traitement	Géotype	Jours								
		7	10	13	16	19	22	25	28	31
FopR1XF21	Jl1214	1,30	1,68	2,00	1,90	1,87	1,96	1,94	2,07	2,07
	Messire	1,20	1,63	1,54	2,09	1,54	1,71	1,80	2,77	2,77
	Jl1210	1,23	1,70	2,17	1,92	1,57	1,24	1,13	2,19	2,19
	P21	1,39	1,53	4,37	1,79	1,81	1,56	1,79	2,95	2,95
	Kelvedon	1,55	1,90	2,14	1,87	2,30	2,24	2,16	2,68	2,68
FopR1XMeso	Jl1214	1,09	1,11	1,25	1,26	1,44	1,71	1,58	2,07	2,07
	Messire	1,07	1,16	1,14	1,24	1,43	1,54	1,99	2,64	2,64
	Jl1210	1,11	1,15	1,01	1,11	1,23	1,45	1,47	2,36	2,36
	P21	1,39	1,37	1,37	1,40	1,39	1,59	1,93	2,91	2,91
	Kelvedon	2,13	2,10	2,98	3,07	3,17	3,26	3,55	3,51	3,51
FopR1XSino	Jl1214	1,09	1,29	1,38	1,49	1,64	1,74	2,00	2,45	2,45
	Messire	1,12	1,40	1,60	2,13	3,23	3,95	3,95	5,00	5,00
	Jl1210	1,47	1,93	2,64	3,04	4,04	5,00	5,00	5,00	5,00
	P21	1,59	2,18	3,45	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
	Kelvedon	1,12	1,21	2,32	4,90	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
FopR1XRL	Jl1214	1,33	1,40	1,70	1,60	1,65	1,82	2,06	2,52	2,52
	Messire	1,29	1,55	1,60	1,53	1,77	1,86	2,50	3,59	3,59
	Jl1210	1,08	1,07	1,11	1,06	1,22	1,39	2,10	2,78	2,78
	P21	1,20	1,24	1,39	1,37	1,62	1,82	2,34	4,07	4,07
	Kelvedon	1,11	1,26	1,38	1,56	1,60	1,93	1,95	3,39	3,39
FopR1XRLM	Jl1214	1,24	1,31	1,40	1,47	1,49	1,55	1,75	1,90	1,9
	Messire	1,05	1,08	1,10	1,14	1,18	1,89	2,46	3,62	3,62
	Jl1210	1,08	1,29	1,29	1,34	2,03	2,10	2,16	2,26	2,26
	P21	1,27	1,31	1,47	1,51	1,63	1,83	2,58	3,65	3,65
	Kelvedon	1,10	1,32	1,63	1,66	1,67	2,25	2,26	3,00	3,00

Tableau 12: Sévérité des symptômes des génotypes étudiés bactérisés en interaction avec Fop R2F42.

Traitement	Génotype	Jours								
		7	10	13	16	19	22	25	28	31
FopR2F42XF21	Jl1214	1,32	1,33	1,35	1,44	1,47	1,49	2,30	2,34	2,34
	Messire	1,23	1,30	1,30	1,47	1,48	1,60	2,66	4,14	4,14
	Jl1210	1,12	1,13	1,14	1,16	1,18	1,85	2,35	3,76	3,76
	P21	1,45	1,60	1,66	1,78	3,62	4,10	5,00	5,00	5,00
	Kelvedon	1,90	2,08	2,32	2,39	2,65	2,85	4,36	5,00	5,00
FopR2F42XMeso	Jl1214	1,46	1,80	2,02	2,08	2,12	2,38	2,74	2,74	2,68
	Messire	1,27	1,37	1,59	1,82	2,53	2,92	3,19	4,46	4,46
	Jl1210	1,47	2,24	2,71	3,02	4,72	4,67	5,00	5,00	5,00
	P21	1,95	2,60	2,91	3,69	4,31	4,33	4,48	5,00	5,00
	Kelvedon	1,58	2,50	3,12	3,21	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
FopR2F42XSlino	Jl1214	1,25	1,87	1,91	2,25	2,51	2,63	2,70	3,22	3,22
	Messire	1,16	1,77	3,51	4,52	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
	Jl1210	1,48	1,56	2,95	3,19	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
	P21	1,51	2,92	4,75	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
	Kelvedon	1,32	2,17	2,02	3,60	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
FopR2F42XRRL	Jl1214	1,46	1,48	1,84	2,04	2,06	2,07	2,31	2,61	2,61
	Messire	1,13	1,19	1,36	1,38	2,27	3,34	3,86	4,39	4,39
	Jl1210	1,35	1,77	1,93	2,50	3,68	4,19	4,54	5,00	5,00
	P21	1,66	2,62	3,90	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
	Kelvedon	1,22	2,08	2,12	2,74	4,44	5,00	5,00	5,00	5,00
FopR2F42XRRLM	Jl1214	1,27	4,15	1,74	1,84	1,93	2,11	2,42	2,51	2,51
	Messire	1,14	1,36	1,61	1,84	3,60	2,85	3,66	5,00	5,00
	Jl1210	1,21	1,68	2,57	3,26	4,31	4,33	4,70	5,00	5,00
	P21	1,42	2,09	3,07	4,30	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
	Kelvedon	1,00	1,00	1,00	1,40	1,50	3,10	4,00	5,00	5,00



Figure 20: exemple d'expression symptomatologique sur génotype JI1412.



Figure 21: exemple d'expression symptomatologique sur génotype P21.

1.3 L'AUDPC

Les cinq souches bactériennes (*Pseudomonas fluorescens*, *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, et *Mutant Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*.), ont montré une activité antagoniste vis-à-vis des deux souches de *Fusarium oxysporum* f.sp.*pisi* (R1 et R2F42) avec les cinq génotypes de pois (JI1412, Messire, JI1210, P21 et Kelvedon Wonder Peas). Cette inhibition est détectable durant les 31 jours de suivi du développement de la

maladie, par le calcul de l'AUDPC qui permet d'évaluer la progression de la maladie durant cette période d'expérimentation.

D'après les résultats obtenus, en comparant l'action des deux agents phytopathogènes, nous constatons que l'évolution de l'AUDPC montre clairement que *Fop* R2F42 est plus virulent que *Fop* R1.

En comparant les valeurs d'AUDPC enregistrées par les cinq génotypes, nous constatons que le génotype ayant enregistré les valeurs d'AUDPC les plus élevés est le génotype P21, avec des valeurs de 1100.36 (*Fop* R1) et de 2201.82 (*Fop* R2F42), alors que le génotype ayant enregistré les valeurs d'AUDPC les plus faibles est le génotype Kelvedon Wonder Peas avec des valeurs de 1054.05 (*Fop* R1) et de 1556 (*Fop* R2F42).

D'après les résultats, nous constatons généralement que les deux souches bactériennes *Pseudomonas fluorescens* (F21) et *Mesorhizobium loti* ont plus d'effet de biocontrôle que les autres souches, à titre d'exemple le génotype JI1412 en interaction avec la souche F21 a enregistré des valeurs de 658.48 (*Fop* R2F42), et 597.23 (*Fop* R1), et le génotype Messire en interaction avec *Mesorhizobium loti* a enregistré des valeurs de 1273.01 (*Fop* R2F42), et 821.73 (*Fop* R1). Toutefois en comparant l'effet antagoniste de la souche de *Pseudomonas fluorescens* avec celui des quatre souches de *Rhizobia*, nous constatons que *Pseudomonas fluorescens* a un plus fort effet de biocontrôle, à titre d'exemple, en interaction avec la souche pathogène *Fop*R1, la souche Pf F21 a enregistré une valeur d'AUDPC de 597,22, alors que *Mesorhizobium loti* a enregistré une valeur de 832,86.

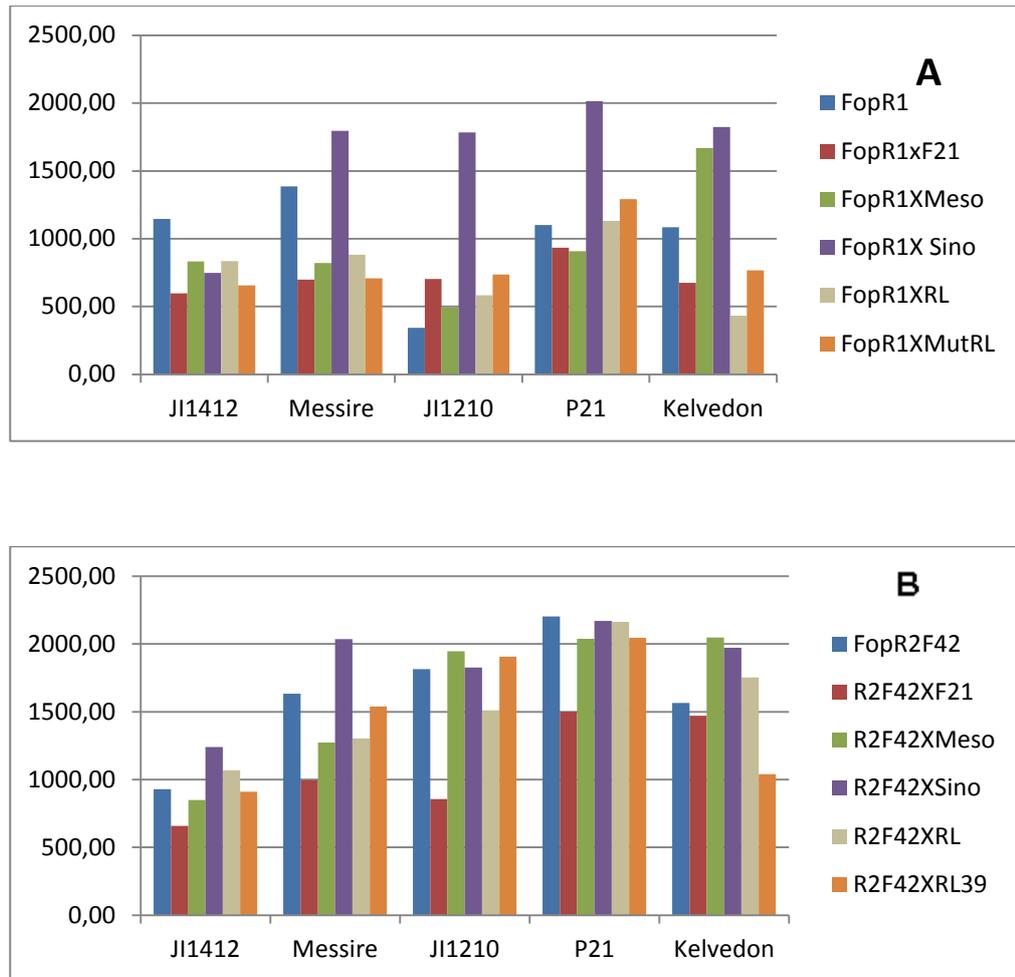


Figure 22: AUDPC sur les cinq géotypes de pois.

1.4 Effet de nodulation

Ce paramètre n'a pas été pris en considération, vu l'effet nodulant des quatre souches des *Rhizobiaceae* qui s'est avéré négatif après un mois de suivi.

2. Discussion d'antagonisme *in situ*

Les résultats obtenus dans le test de biocontrôle *in situ*, concordent avec ceux déjà obtenus dans plusieurs recherches sur des essais réalisés sous serre ou en plein champ (Benchabane, 2005 ; Toua et al., 2013 ; Ouserir., 2009 ; Yala., 2016). Ces essais montrent l'effet bénéfique des rhizobactéries en tant qu'agent de biocontrôle contre les agents pathogènes tellurique (Lemanceau, 1992).

Selon les résultats obtenus, nous constatons que les cinq souches antagonistes ont permis de réduire considérablement l'infection de la maladie ainsi que sa sévérité, ayant un effet positif direct sur la réduction des valeurs d'AUDPC. En comparant les valeurs d'AUDPC, nous constatons que le génotype à valeurs les plus élevés est le génotype P21, donc il s'agit du génotype le plus sensible, alors que génotype à valeurs d'AUDPC les plus faibles est le génotype Kelvedon Wonder Peas, qui représente le génotype le plus résistant.

A la fin de l'expérimentation sous serre, nous avons constaté que les quatre souches bactériennes des *Rhizobiaceae* présentaient un effet nodulant négatif, et cela peut être expliqué soit par une faible concentration bactérienne (DREVON, 2011), ou par un stress environnemental, due principalement à la sécheresse qui a tendance à contrarier le développement et le fonctionnement des nodosités. Il s'avère aussi que les espèces annuelles sont généralement plus nodulées que les pérennes (HALLIDYA, 1981).

Les maladies causées par le champignon tellurique phytopathogène *Fusarium oxysporum* f.sp.*pisi*, peuvent provoquer de graves dommages sur le pois. Dans les conditions de culture, la lutte biologique pourrait être réalisée par l'application de certaines souches de *Rhizobiaceae*, de *Pseudomonas* spp fluorescents ou *Fusarium oxysporum* non pathogène. Soixante-quatre souches de *Pseudomonas* spp fluorescents ont été testés pour leur capacité à réduire l'incidence de la fusariose, appliquées seules ou en association avec une souche non pathogène présélectionnée de *Fusarium oxysporum* (*Fop47*), les résultats ont été bien prometteurs (Lemanceau, 1991).

Ces produits chimiques sont considérés comme l'arme la plus efficace pour faire face à ces problèmes, mais ces substances ont des conséquences néfastes sur l'environnement comme l'accumulation des résidus et la pollution des sols, l'apparition et la généralisation des mécanismes de résistance chez les pathogènes, le déséquilibre écologique, dû au fait que beaucoup de ces composés de synthèse ont un large spectre d'action, détruisant non seulement les agents nuisibles, mais également les autres populations de l'écosystème (Kouassi 2001; Thakore 2006).

La lutte biologique avait été une approche importante pour la gestion de la santé des plantes. (Guanpeng *et al.*, 2012).

De nombreuses études sont dédiées à l'écologie des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Les bactéries appartenant à ces espèces, présentent en effet un grand intérêt, certaines améliorent la croissance et la santé des plantes, en contribuant à réduire l'utilisation d'intrants de synthèse en agriculture, d'autres sont capables de réduire les oxydes d'azote et de dégrader les composés xénobiotiques (Bossis *et al.*, 2000).

Plusieurs études ont récemment montré qu'en plus de la stimulation de la nodulation et de la fixation d'azote, l'inoculation des *Rhizobium* avec quelques souches PGPR augmente la croissance et le rendement des légumineuses (Pirlak, et Köse., 2009). Ces PGPR contribuent à l'amélioration de la croissance de la plante par différentes manières : la synthèse de phytohormones (auxine, cytokinines), solubilisation d'éléments minéraux et la chélation du fer (Robin *et al.*, 2008, Collavino *et al.*, 2010, Adesemoyea *et al.*, 2010. Egamberdieva *et al.*, 2010), la production de l'AIA, et peuvent également inhiber les pathogènes telluriques par la production de métabolites antimicrobiens, tels que les antibiotiques et le HCN, ou bien par la compétition par rapport aux nutriments et à l'espace (Glick *et al.*, 2007) .

3. Résultats d'antagonism *in vitro*

Les tests d'antagonisme *in vitro*, montrent que les quatre souches de *Rhizobium* spp. (*Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viceae* et Mutant *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*) et la souche de *Pseudomonas fluorescens* (Pf F21), exercent des effets antagonistes vis-à-vis des deux isolats fongiques de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (Fop) (R1, et R2F42), mais a des degrés divers. Cette variation dépend des souches antagonistes utilisées et aussi des milieux de culture où elles sont cultivées (YMA, PDA, Mixte1, KB et Mixte2).

3.1 Inhibition de la croissance mycélienne

Les cinq souches bactériennes ont montré des activités antagonistes appréciables vis-à-vis des deux souches fongiques phytopatogènes de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisii* (R1 et R2F42), sur les cinq milieux gélosés. Cette inhibition est détectable durant les 72h d'observation, par la formation des zones d'inhibitions vis-à-vis des isolats fongiques selon la méthode expérimentée (méthode de spots) (Figure 23 et tableaux 13, 14).

Dans tous les essais, nous remarquons que la croissance mycélienne du pathogène en interaction avec les cinq souches bactériennes, sur les cinq milieux de culture, est nettement inférieure par rapport aux témoins (Fop R1 et Fop R2F42) (Figure 23 et tableau 13, 14).

Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne envers la souche pathogène FopR1 est plus élevé avec les deux souches bactériennes *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti* qu'avec les trois autres souches, avec un taux d'inhibition maximal de l'ordre de 24.93% (*Sinorhizobium meliloti*) et 33.33% (*Mesorhizobium loti*) après 24h, de 27.47% (*Sinorhizobium meliloti*) et 38.61% (*Mesorhizobium loti*) après 48h, de 51.45% (*Sinorhizobium meliloti*) et 46.01% (*Mesorhizobium loti*) après 72h (tableau). Le milieu mixte2 (YMA+PDA), a montré l'activité inhibitrice la plus élevée avec la souche antagoniste *Sinorhizobium meliloti* (51.45%) (Tableau 13).

Alors qu'envers la souche fongique FopR2F42, le taux d'inhibition de la croissance mycélienne est plus élevé avec la souche *Mesorhizobium loti*, avec un taux d'inhibition maximal de l'ordre de 40.71% après 24h, 52,65% après 48h, et 57,55% après 72h dans le milieu PDA.

Nous remarquons que les quatre souches de *Rhizobium* spp. montrent une activité inhibitrice plus importante sur le milieu YMA que sur les deux autres milieux (PDA et Mixte2), avec un taux maximal de 65,39% (FopR2 X Mutant *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*), alors que *Pseudomonas fluorescens* F21 présente une activité antagoniste plus élevée sur le milieu mixte1 (KB+PDA) avec un taux d'inhibition maximal de 43.92% (Tableau 14).

Résultats et Discussions

Tableau 13: Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne de FopR1 sur les cinq milieux de culture après 24h, 48h, et 72h.

Traitements	Temps	Milieux		
		YMA	PDA	Mixte2
<i>Fop R1 X Sino</i>	24h	14,99 ± 9,11	18,96±3,09	24,93±4,5
	48h	27,36 ± 7,5	17,74±2,26	27,47±0,64
	72h	41,13 ± 5,54	39,62±6,66	51,45±1,02
<i>Fop R1 X Meso</i>	24h	22,68 ± 10,07	33,33 ± 5,47	28,65±0,75
	48h	38,61 ± 3,34	37,87 ± 7,09	35,59±0,63
	72h	43,79 ± 2,67	37,92 ± 2,8	46,01±0,51
<i>Fop R1 X RL</i>	24h	15,32 ± 3,22	7,76 ± 3,79	15,70±6,53
	48h	35,77 ± 1,40	15,51±2,93	20,98±3,20
	72h	37,11 ± 2,80	32,41±6,96	26,44±16,80
<i>Fop R1 X Mutant RL</i>	24h	11,31±0,58	0	8,29±1,80
	48h	29,26±1,41	9,29±2,61	18,47±3,99
	72h	43,03±1,08	26,48±8,81	36,41±5,06
<i>Fop R1 X F21</i>		KB	PDA	Mixte1
	24h	1,36±2,31	7,47±6,66	11,6±0
	48h	24,11±1,90	9,78±3,07	31,77±1,63
	72h	31,48±1,28	29,45±8,65	40,32 ± 0,99

Tableau 14: Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne de FopR2F42 sur les cinq milieux de culture après 24h, 48h, et 72h.

Traitements	Temps	Milieux		
		YMA	PDA	Mixte2
<i>Fop R2 F42X Sino</i>	24h	23,76±5,42	26,8±2,22	20,08±2,84
	48h	31,43±6,78	31,86±1,91	26,32±3,52
	72h	47,03±9,71	57,37±3,12	44,46±8,41
<i>Fop R2F42 X Meso</i>	24h	32,67±2,8	48,71±7,5	31,42±2,86
	48h	40,53±1,72	52,65±8,09	37,38±3,44
	72h	48,45±0	57,55±5,78	43,31±2,10
<i>Fop R2 F42 X RL</i>	24h	43,06±3,65	6,95±8,13	17,38±3,23
	48h	50,03±6,17	9,95±8,24	20,81±2,49
	72h	51,8±3,23	24,1±10,58	16,6±6,54
<i>Fop R2F42 X M RL</i>	24h	30,93±7,89	11,59±3,07	6,46±4,10
	48h	42,55±4,76	20,35±3,15	20,12±2,65
	72h	65,39±5,38	38,30±6,74	42,93±3,37
<i>Fop R2 F42X F21</i>		KB	PDA	Mixte1
	24h	0,34±0,58	16,24±4,41	21,58 ± 26,04
	48h	26,05±1,68	18,43±0,98	32,76 ± 10,60
	72h	34,07±0,74	22,06±3,01	43,92 ± 5,36

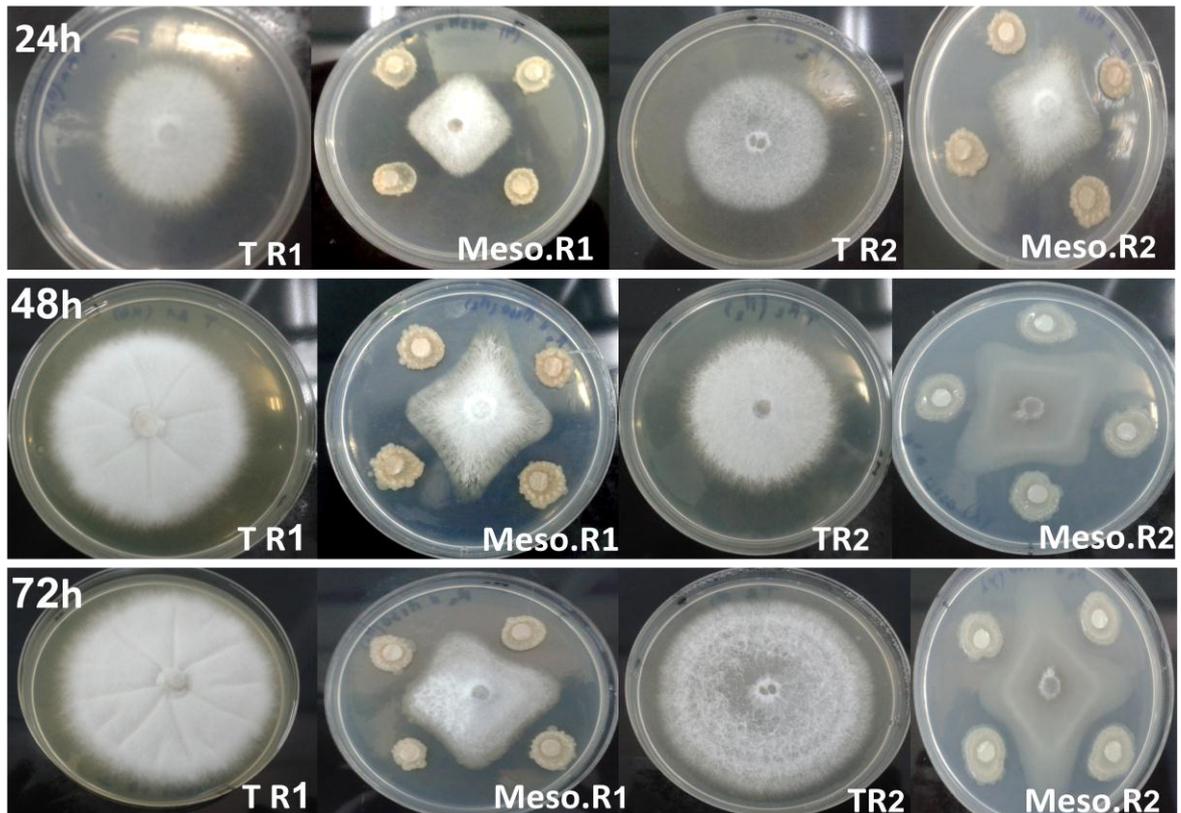


Figure 23: Exemples des activités antagonistes de la souche *Mesorhizobium loti* vis-à-vis des deux souches de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* après 24h, 48h, 72h sur milieu YMA.

4. Discussion d'antagonisme *in vitro*

Les résultats obtenus à partir des tests d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats *Fop*, ont montré que les quatre souches de *Rhizobium* spp. et la souche *Pseudomonas fluorescens*, inhibent fortement les agents fongiques sur les cinq milieux de culture (YMA, PDA, Mixte1, KB, et mixte2).

D'après les résultats obtenus, nous constatons que les performances *in vitro* sont corrélées à ceux d'*in situ*, avec les bactéries à effets antagonistes les plus élevés sont les deux souches *Pseudomonas fluorescens* F21 et *Mesorhizobium loti*.

Nous pouvons attribuer l'activité antagoniste exercée par les cinq souches, à la synthèse de métabolites secondaires particulières (Hass et al ; 1991, Weller et Thomashow 1993).

Le pouvoir antagoniste observé chez les *Pseudomonas* spp., est attribué en partie aux sidérophores produits par ces bactéries (Lemanaceau, 1992). Le fer est un élément indispensable à la germination conidienne, la production en quantité importantes de métabolites chélateurs de Fe^{3+} permet aux *Pseudomonas* spp. *Fluorescents* de s'appropriier tout le fer nécessaire à leur croissance, vue leur forte affinité de le rendre inaccessible aux micro-organismes vivants dans le même milieu (Jaques et al.; 1994). Ces bactéries interviennent dans la suppression des maladies par le phénomène de compétition vis –à-vis du fer avec les micro-organismes phytopatogènes (Le manceau, 1992).

D'après nos résultats sur les milieux PDA et (PDA+KB) qui ne favorisent pas la production du pigment fluorescent, les souches bactériennes se caractérisent par des activités antagonistes importantes. Ceci peut s'expliquer par l'implication d'autres mécanismes d'action, en montrant que la fluorescence, signe de synthèse de sidérophores, n'est pas subordonnée obligatoirement à l'activité antagoniste. Des constatations similaires ont été révélées par plusieurs travaux avec des essais en milieux non carencés en fer (Digat, 1983; Geels et schippers, 1983).

L'effet antagoniste des *Pseudomonas fluorescens*, peut être du à la synthèse d'antibiotique ou d'autre métabolites à effet inhibiteur. D'après les travaux de Howell et Stipanovic (1980) il y a implication de deux antibiotique pyolutéorine et la pyvolnitrine synthétisées pas la souche Pf5 de *Pseudomonas fluorescens*.

Il a été démontré que les souches des *Rhizobiaceae*, peuvent également inhiber les pathogènes telluriques par la production de métabolites antimicrobiens, tels que les antibiotiques et le HCN, ou bien par la compétition par rapport aux nutriments et à l'espace (Glick et al., 2007) .

Les variations des zones d'inhibition peuvent être par d'éventuelles intensités de production de métabolites secondaires à 24H et 48H, et leur probable dégradation après 72H.

Parmi les autres métabolites qui peuvent intervenir dans l'antagonisme microbien, nous avons l'augmentation de la concentration du glucose dans le

milieu de culture, qui peut induire une réduction du taux d'inhibition de certains champignons (Lemanceau, 1992).

Ces principaux mécanismes d'action de ces rhizobactéries, peuvent être la cause de l'activité antagoniste vis-à-vis de Fop. Ces mécanismes peuvent agir séparément ou simultanément dans l'inhibition de la croissance des populations de Fop.

Conclusion

Le contrôle biologique des maladies dues à des pathogènes du sol, par l'introduction de microorganismes bénéfiques dans la rhizosphère a été proposé comme une alternative à l'utilisation des substances chimiques. Certaines bactéries associées aux plantes particulièrement les rhizobactéries ; *Pseudomonas* spp. fluorescents et celle du genre *Rhizobium* sp ont fait l'objet d'explorations suppressives des maladies des cultures par antagonisme direct entre la bactérie et les phytopathogènes du sol.

L'implication des champignons dans les dégâts et les pertes économiques causées signifie qu'il ya un effort constant pour produire des cultures sécurisées et de développer de nouveaux agents antifongiques (Pandey et al., 1982).

L'utilisation des PGPR, peut permettre de stimuler la croissance des plantes et de réduire l'effet des agents phytopathogènes.

D'après notre expérimentation, l'application des cinq souches rhizobactériennes , en tant qu' agent de lutte contre la fusariose vasculaire de pois, nous a permis de mettre en évidence des potentialités de biocontrôle chez ces souches étudiées.

le test de biocontrôle *in situ*, montre que les cinq souches antagonistes ont permis de réduire considérablement l'infection de la maladie ainsi que sa sévérité.

Le test d'inhibition *in vitro*, montre aussi l'efficacité de ces rhizobactéries antagonistes vis-à-vis *Fusarium oxysporum* f.sp.*pisi*.

La réussite de la lutte biologique consiste d'identifier les causes d'échec, par la connaissance des propriétés que doit avoir un agent de biocontrôle, ou bien par une meilleur compréhension des conditions environnementales nécessaire à son maintien, son développement et son efficacité (Nikolay et al., 2005)

Pour la poursuite de ce travail, Il est fortement souhaitable d'approfondir les investigations par d'autres tests et caractérisations afin de réaliser un criblage efficace permettant la sélection de souches performantes et durables à l'échelle de production.

Références bibliographiques

- **Abdul Ghafoor, Zahoor Ahmad and Rashid Anwar, 2005**, genetic diversity in *Pisum sativum* and a strategy for indigenous biodiversity conservation Plant Genetic Resources Program, Institute of Agri Biotechnology and Genetic Resources
- **Aberoumand, A. 2010**. A review on *Pseudomonas* in marine fish. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 2(4):291-296.
- **Adesemoyea A.O., TorBERTB H.A., Kloeppera. J.W., 2010**. Increased plant uptake of nitrogen from ¹⁵N-depleted fertilizer using plant growth-promoting rhizobacteria. *Appl. Soil Ecol.*, 46 (1), 54-58.
- **Agrios, G.N., 2005**, "Plant pathology", 5th edition. Department of plant pathology. University of Florida, Elsevier Academic Press, 948 p.
- **Agropedia :**
<http://agropedia.iitk.ac.in/sites/default/files/fusarium%20wilt1.jpg>
- **Ali, S.k.Z, Sandhya. V, Grover. M, Kishore. N, Rao. L.V, et Venkateswarlu.B, 2009**. *Pseudomonas* sp. strain AKM-P6 enhances tolerance of sorghum seedlings to elevated temperatures. *Biol. Fert. Soils*. 46: 45-55.
- **Bani. M, 2015**, "Multidisciplinary approaches including histological, biochemical and molecular tools to study the resistance mechanisms to fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* in pea (*Pisum sativum*)", PhD thesis, Department of genetics, University of Cordoba, Spain, (2015), 187p.
- **Bano. A et Fatima.M, 2009**. Salt tolerance in *Zea mays* (L.) following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biol. Fert. Soils*. 45: 405-413.
- **Bashan, Y. et Holguin, G , 1998**. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant-growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol Biochem* 30:1225-1228.
- **Beauchamp Chantai J, 1993**. « Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique », *Phytoprotection*, vol. 74, n° 1, p. 19-27.

- **Begum, A.A., Leibovitch. S, Migner. P, Zhang. F, 2001.** Specific flavonoids induced nod gene expression and pre-activated nod genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *Journal of Experimental Botany* 52: 1537-1543.
- **Benchabane, M., 2005.** Caractérisation des effets d'antagonisme microbienne et de promotion de la croissance végétale de souche de *Pseudomonas* spp. *fluorescents*, Thèse de Doctorat d'Etat, FSB-UTHB, Alger, 235p.
- **Biddle, JA., Cattin N.D., 2007,** «Pests and diseases of peas and beans: a colour" , 128p.
- **Blancard. D, 1998,** Maladies du tabac : Observer, identifier, lutter. Ed.INRA, Paris, 375 p.
- **Bloemberg. G.V., Lugtenberg. B.J, 2001.** Molecular Basis of Plant Growth Promotion and Biocontrol by Rhizobacteria. *Urrerot Pinionsin Plant Biology* 4 : 343-350.
- **Blumer,C, and Haas. D, 2000.** Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol.* 173: 170-177
- **Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L., 2000.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .20: 51-63.
- **Bounaga , R., 1985,** "Contribution à l'étude de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedenis* (Killian et Maire) Gordon, agent de la fusariose de palmier dattier ", Thèse Doc, U.S.T.H.B. Alger, 180p.
- **Boyeldieu, J, 1991.** Produire des grains oléagineux et protéagineux. Paris, Lavoisier Tec&Doc, 256p
- **Cappe, P., Mourey. A, Et Kilbertus.G, 1994.** Variation of lipolytic activity in the genus *Acinetobacter* sp. *Journal of General and Applied Microbiology* 4:113-114.
- **Champion. R, 1997,** Identifier les champignons transmis par les semences : Techniques et pratiques. Ed. Quae, Paris, 398 p.
- **Chin-A-Woeng, T. F. C., G. V. Bloemberg, A. J. van der Bij, K. M. G. F. van der Drift. J, Schripsema, 1998.** Biocontrol by phenazine-1-

- carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11:1069-1077.
- **Cline, G. R., P. E. Powell, P. J. Szaniszlo, and C. P. P. Reid. 1982.** Comparison of the abilities of hydroxamate, synthetic and other organic acids to chelate iron and other ions in nutrient solution. *Soil Science Society of America Journal* 46:1158-1164.
 - **Cline, G. Reid. P, Powell. E, and Szaniszlo. P. J. 1984.** Effects of a hydroxamate siderophore on iron absorption by sunflower and sorghum. *Plant Physiology* 76:36-39.
 - **Collavino.M. M, Sansberro P.A., Mroginski L.A., AGUILAR. O.M., 2010.** Comparison of *in vitro* solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biol. Fertil. Soils*, 46 (7), 727-738.
 - **Cook, R., Baker, K. 1974.** *Biological Control of Plant Pathogens*. Freeman, San Francisco, CA, USA. P 380.
 - **Corbaz,R., 1990,** " *Phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes*", Presses , polytechniques et universitaires romandes,266p.
 - **Coyne, C.J., Inglis, D.A., Whitehead, S.J. and Muehlbauer, F.J.,2000,** "Chromosomal location of Fwf in pea", *Pisum Genetics*, 32, 20 – 22.
 - **Cruden, D. L., J. H. Wolfram, R. D. Rogers, et D. T. Gibson. 1992.** Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with pxylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. *Applied and Environmental Microbiology* 58:2723–2729
 - **Dagher, F., E. Déziel, P. Lirette, G. Paquette, J. C. Bisailon, et R. Villemur. 1997.** Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. *Canadian Journal of Microbiology* 43:368-377.
 - **Darles B. (2013),** Évaluation de l'efficacité de différents produits de biocontrôle, pour lutter contre la fusariose du *Dipladenia*. Rapport de stage, « Bioingénierie » option Biotechnologie végétales, Université Paul Sabatier, Toulouse, 35 p.

- **Day DA, Poole PS, Tyerman SD, Rosendahl L. 2001.** Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 58: 61–71. ;
- **De Souza, J. T., And Raaijmakers, J. M. 2003.** Polymorphism Within The Prnd And Pltc Genes From Pyrrolnitrin And Pyoluteorin-Producing *Pseudomonas* And *Burkholderia* Spp. *FEMS Microbio. Ecol.* 43. 21-34.
- **Defago, G., et Haas, D., 1990,** " *Pseudomonas* as antagonists of soilborne plant pathogens: Modes of action and genetic analysis", in: *Soil Biochem*, 6.J.M. Bollag et G. Stotzky,eds. Marcel Dekker, New York,249-291.
- **Dénarié J., Debellé F., Promé J.C. 1996.** Rhizobium lipochitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* 65, 503-35.
- **Denarie, J., Debelle, F., and Rosenberg, C. 1992.** Signaling and host range variation in nodulation. *Annu Rev Microbiol* 46, 497-531.
- **Digat . B, 1991.** A new encapsulation technology for bacterial inoculants and seed bacterization. In: *Plant growth-promoting rhizobacteria-progress and prospects* (C Keel, B Koller, G Defago, eds) IOBCI WPRS, XIV18, 383-391
- **Downie JA. 2005.** Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Current Biology*. 15: 6.
- **DREVN J.J., ALKAMA N., ARAUJO A.P., BEEBE M., BLAIR M, ATTAR H., JAILLARD B., LOPEZ A., MARTINEZ-ROMERO E., PRODINO P., TAJINI F. & ZAMAN-ALLAH M., 2011.** Nodular diagnosis for ecological engineering of the symbiotic nitrogen fixation with legumes. *Proc. Environ. Sci.* 9, 40-46.
- **Dreyfus B, Dommergues Y. 1981.** Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata*. *FEMS Microbiology Letters*. 10: 313–317.
- **Dwivedi, D., et B. N. Johri. 2003.** Antifungals from fluorescent pseudomonads: Biosynthesis and regulation. *Current Science* 85:1693-1703.
- **Egamberdieva D., G. Berg, K. Lindström, L.A. Räsänen., 2010.** Co-inoculation of *Pseudomonas* spp. with *Rhizobium* improves growth and

- symbiotic performance of fodder galega (*Galega orientalis* Lam.). *Eur. J. Soil Biol.*, 46, 269-272.
- **El Hadrami I., Bellaj M., Idrissi A., J'Aiti F., Jaafari S. and Daayf F. 1998.** Biotechnologie végétales et amélioration du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), pivot de l'agriculture oasienne marocaine. *Cahiers Agriculture*. 7 (6): 463-468.
 - **Elad, Y., and R. Baker. 1985.** The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamyospore germination of *Fusarium* sp. by *Pseudomonas* spp.. *Ecology and Epidemiology* 75:1053-1059.
 - **FAOSTAT 2011.** FAOSTAT-Agriculture., "Food and agricultural commodities production. Food and agriculture organization", Rome.
 - **Fernon J-P. 1970.** Etude de la pénétration et de la colonisation du *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*. SN. & H, Influence des facteurs écologiques sur ce phénomène et sur l'extériorisation des symptômes sur plantules de Melon. Mémoire, Diplôme d'Ingénieur des Techniques Agricoles, ENITA de Bordeaux, Bordeaux, 30 p.
 - **Fernon J-P. 1970.** Etude de la pénétration et de la colonisation du *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*. SN. & H, Influence des facteurs écologiques sur ce phénomène et sur l'extériorisation des symptômes sur plantules de Melon. Mémoire, Diplôme d'Ingénieur des Techniques Agricoles, ENITA de Bordeaux, Bordeaux, 30 p.
 - **Fisher HM. 1994.** Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiology Reviews*.58: 352–386.
 - **Fourie, G., Steenkamp, E.T., Ploetz, R.C., Gordon, T.R. and Viljoen, A., 2011** "Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex", *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 533 - 542.
 - **Fravel D., Olivain C. and Alabouvette C. 2002.** *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*, v. 157, pp. 493-502.
 - **Gage D.J. 2004** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 280-300.

- **Garbaye J, Bowen GD, 1987.** Effect of different microflora on the success of ectomycorrhizal inoculation of *Pinus radiata*. *Can J For Res* 17, 941 -943
- **Gardner, J. M., J. L. Chandler, and A. W. Feldman. 1984.** Growth promotion and inhibition by antibiotic-producing fluorescent pseudomonads on citrus roots. *Plant and Soil* 77:103-113.
- **Geurts R., Fedorova E., Bisseling. T, 2005.** Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Curr Opin Plant Biol.*
- **Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC. 2008.** Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics.* 42: 413–441.
- **Giraud E, Fleischman D. 2004.** Nitrogen-fixing symbiosis between photosynthetic bacteria and legumes. *Photosynthesis Research.* 82: 115–130.
- **Glick B.R., Todorovic .B, Czarny.J, Cheng.Z, Duan.J, Mcconkey.M, 2007.** Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 26 (5), 227–242.
- **Gnanamanickam, Samuel S. 2007.** *Plant-Associated Bacteria*, University Of Madras, Chennai, India, 712 P, (ISBN 9781402045370), P. 423.
- **Gough C., Cullimore J. 2011.** Lipo-chitooligosaccharide Signaling in Endosymbiotic Plant-Microbe Interactions. *MPMI Vol. 24, No. 8, 2011*, pp. 867–878.
- **Gowhar Ahmad, Mudasir, Rajdeep Kudesia, Shikha, M K Srivastava,2010,"** Evaluation Of Genetic Diversity In Pea (*Pisum sativum* L) Using RAPD Analysis" , *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, Volume 2010: GEBJ-16, Institute of Basic Sciences, Department of Botany, Bundelkhand University, Jhansi (UP) 284128, India.
- **Grajal-Martin, M.J. and Muehlbauer, F.J., 2002,** “Genomic location of the *Fw* gene for resistance to fusarium wilt race 1 in peas”, *Journal of Heredity*, 93, , 291 - 293.
- **Grimes HD, Mount MS , 1987.** Influence of *Pseudomonas putida* on nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Soil Bi01 Biochem* 6, 27-30

- **Guanpeng Gao, Danhan Yin, Shengju Chen, Fei Xia, Jie Yang, Qing Li, Wei Wang., 2012.** Effect of Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* 2P24 on Soil Fungal Community in Cucumber Rhizosphere Using T-RFLP and DGGE, 10: 16p.
- **Guimaraes, E.P., Ruane, J., Scherf, B.D., Sonnino, A. and Dargie, J.D., 2007,** “Marker-Assisted Selection, Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish”, FAO, Rome, 494p.
- **Haas, D. And Defago, G. 2005.** Biological Control Of Soil-Borne Pathogens By Fluorescent *Pseudomonads*. *Nature Reviews Microbiology* 3(4):307-319.
- **Hagedorn, D.J., 1984,** “Compendium of pea diseases”, American Phytopathological Society, Saint-Paul, Minnesota, USA, (1984), 57p.
- **HALLIDYA J. 1981.** Nitrogen fixation by leucaena in acid soils. *Leuceana Res. Rep.*, 2,71-121
- **Hayat .R, Safdar 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
- **Hirsch, A.M., Lum, M.R., Downie, J.A., 2001.** What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special? *Plant Physiology* 127: 1484-1492.
- **Hofte M, Boelens J, Vestraete W , 1991.** Seed protection and promotion of seedling emergence by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strain 7NSK2 and ANP15. *Soil Bi01 Biochern* 23, 407-410
- **Howell, C. R., and R. D. Stipanovic. 1980.** Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin. *Phytopathology* 70:712-715.
- **Howell, C. R., and R. D. Stipanovic. 1979.** Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* 69:480-482.
- **Iida Y., Ohara T. and Tsuge T. 2006.** Identification of genes up-regulated during conidiation of *Fusarium oxysporum* through expressed sequence tag analysis. *Fungal Genetics and Biology*, n°43, pp. 179-189.
- **Infantino, A., Kharrat, M., Riccioni, L., Coyne, C.J., McPhee, K.E. and Grunwald, N.J., 2006,** “Screening Techniques and Sources of

- Resistance to Root Diseases in Cool Season Food Legumes”, *Euphytica* 147, 201 - 221.
- **Jeunot B. 2005.** Les fusariotoxines sur céréales : Détection, risque et nouvelle réglementation. Thèse, Doctorat en Pharmacie, Université Henri Poincaré, Nancy, 125 p.
 - **Journet E.P. 2004.** symbioses racinaires. Fiche 4. L'agriculture peut-elle utiliser moins d'engrais. [www .crdp-toulouse.fr](http://www.crdp-toulouse.fr)
 - **Kaminski PA, Boistard P. 1998.** A survey of symbiotic nitrogen fixation by rhizobia. In the *Rhizobiaceae*, pp. 431–460. In Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ (eds). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic.
 - **Keel, C., P. H. Wirthner, T. H. Oberhansli, C. Voisard, D. Burger, D. Haas, and G. Defago. 1990.** Pseudomonads as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: role of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. *Symbiosis* 9:327-341.
 - **Keel, C., C. Voisard, C. H. Berling, G. Kadr, and G. Defago. 1989.** Iron sufficiency, a prerequisite for the suppression of tobacco root rot by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 79:584-589.
 - **Khan M.S., Zaidi .A. 2005.** Interactive Effect Of Rhizospheric Microorganisms On Growth,
 - **Khan M.S., Zaidi .A. 2005.** Interactive Effect Of Rhizospheric Microorganisms On Growth, Yield And Nutrient Uptake Of Wheat. *J Plant Nutrition*, 28:2079–2092.
 - **Kloepper JW, Scher FM, Laliberte M, Tipping B ,1986.** Emergence-promoting rhizobacteria: description and implications for agriculture. In: Iron, siderophores and plant diseases (TR Swinburne, ed) NATO AS1 Series A, Life Sci, Plenum Press, New York, 351, 155-1 64
 - **Kloepper, J. W., J. Leong, M. Teintze, and M. N. Schroth. 1980.** *Pseudomonas* siderophores: A mechanism explaining disease suppressive soils. *Current Microbiology* 4: 317-320.

- **Kloepper, J.W., Schroth, M.N. 1978.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Radishes. in : Proc Int Conf Plant Pathol Bact. Angers, 379-382
- **Kouassi, M., 2001.** La lutte biologique: une alternative viable à l'utilisation des pesticides? *VertigO*. 2(2).
- **Kraft, J.M., 1994,** Fusarium wilt of peas (a review). *Agronomie* 14, 561–567.
- **Kraft, J.M. And P fleger, F.L., 2001,** Compendium of Pea Diseases, APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 67p.
- **Kraft, J.M. and Pflieger, F.L.,2001,** “Compendium of Pea Diseases and Pests”, 2nd ED., The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, (2001), 67.
- **Lee, J. Y., S. S. Moon, et B. K. Hwang. 2003.** Isolation and antifungal and antioomycete activities of aerugine produced by *Pseudomonas fluorescens* strain MM-B16. *Applied and Environmental Microbiology* 69:2023-2031.
- **Lemanceau P, 1 991** Biological control of Fusarium diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic Fusarium. *Crop Protec* 10, 279-286.
- **Lemanceau, P. 1992.** Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescents. *Agronomie*. 12: 413-437.
- **Lifshitz, R., C. Simonson, F. M. Scher, J. W. Kloepper, C. RodrickSemple, and I. Zaleska. 1986.** Effect of rhizobacteria on the severity of Phytophthora root rot of soybean. *Canadian Journal of Plant Pathology* 8:102-106.
- **Lindberg, G. D. 1981.** An antibiotic lethal to fungi. *Plant Disease* 65:680-683.
- **Lindstrom, K., Murwira, M., Willems, A., Altier, N., 2010.** The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Journal of Microbiology Research* 161: 453-463.
- **Lodwig E, Poole P. 2003.** Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *CRC Crit Rev Plant Sci*. 22: 37–78.

- **Mamoun M, Olivier JM ,1992.** Effect of soil pseudomonads on colonisation of hazel roots by ectomycorrhizal species *Tuber melanosporum* and its competitors. *Plant Soil* 139,265-273
- **Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J. 2009.** Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes? *Trends Microbiol* 17: 458–466.
- **McMaster University :** <http://www.sinorhizobium.org>
- **Merzoug A., Belabid L., Youcef-Benkada M., Benfreha F., Bayaa B. 2014.** Pea Fusarium wilt races in western Algeria. *Plant Protect Sci.*, 50: 70–77.
- **Meyer JR, Linderman RG , 1986.** Response of subterranean clover to dual inoculation with vesiculararbuscular mycorrhizal fungi and a plant growthpromoting bacteria, *Pseudomonas putida*. *Soil Biol Biochem* 18, 185-190
- **Mezaache Samia .2012.** Localisation Des Déterminants De La Suppression De Quelques Souches De *Pseudomonas* Isolées De La Rhizosphère De La Pomme De Terre. Thèse Doctorat, Université Ferhat ABBAS Sétif Faculté Des Sciences De Nature Et De La Vie
- **Montesinos, E., Bonaterra, A. Et Moselio, S. 2009.** Pesticides, Microbial. Dans: *Encyclopedia Of Microbiology* (Moselio, S.), Academic Press, Oxford, UK. Pp. 110-120
- **Neilands, J. B. 1981.** Microbial iron compounds. *Annual Review of Biochemistry* 50:715-731.
- **Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O., 1983,** “*Fusarium* species: An illustrated manual for identification”, The Pennsylvania State University Press, University Park., 193 p.
- **Newton WE. 2007.** Physiology, biochemistry and molecular biology of nitrogen fixation. In: Ferguson BH, SJ NWE (eds) *Biology of nitrogen cycle*. Elsevier, Amsterdam, p 109–130.
- **Nikolay S. Strigul a, Lev V. Kravchenko., 2005.** Mathematical modeling of PGPR inoculation into the rhizosphere. *Environmental modelling & software*.

- **O'Sullivan, D. J., et F. O'Gara. 1992.** Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiology Reviews* 56(4):662-676
- **Oliveira E, Sieverding E, Toros , 1987.** Interaction between three species of VAM fungi and an isolate of *Pseudomonas putida* on cassava. In: Proc 7th North Am Conf Mycorrhizae (DM Sylvia, LL Hung, JH Graham, eds) Univ Florida, Gainesville, FL 216
- **Organic Solite Technology :** <http://organicsoiltechnology.com/wp-pseudomonas-fluorescens-makes-phosphorus-availabl-1.jpg>.
- **Ott, T., van Dongen, J.T., Gunther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., and Udvardi, M.K. 2005.** Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr Biol* 15, 531-535.
- **Ouserir, S., 2009.** Etude des effets de la co-inoculation des rhizobactéries *Pseudomonas* spp. Fluorescents et rhizobium spp. Sur la phytostimulation et la nodulation chez la fève, Thèse de magister, 138p.
- **Pandey D.K., Tripathi N.N., Tripathi R.D., Dixit S.N., 1982.** Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Caesulia axillaris* Roxb. *Angerwandte Botanik*, 56: 256-257.
- **Pant, R. et A. N. Mukhopadhyay. 2001.** Integrated management of seed and seedling rot complex of soybean. *Indian Phytopathology* 54:345-350.
- **Parker, R.B., et P. R. Elliker. 1953.** Effect of spoilage bacteria on biacetyl content and flavor of cottage cheese. *Journal of Dairy Science* 36(8):843-849.
- **Paul La flamme, 1998,** diseases of field pea (*pisum sativum* L.) In the peace river region of alberta
- **Paulsen, I. T., C. M. Press, J. Ravel, D. Y. Kobayashi, G. S. Myers, D. V. Mavrodi, R. T. Deboy, R. Seshadri, Q. Ren, R. Madupu, R. J. Dodson, A. S. Durkin, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, S. A. Sullivan, J. M. Rosovitz, M. L. Gwinn, L. Zhou, D. J. Schneider, S. W. Cartinhour, W. C. Nelson, J. Weidman, K. Watkins, K. Tran, H. Khouri, E. A. Pierson, L. S. Pierson, L. S. Thomashow and J. E.**

- Loper, 2005.** Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat. Biotechnol.* 23, 873-885
- **Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. 2000.** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 64: 180–201.
 - **Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Ton, J., Van Pelt, J.A. And Van Loon, L.C.2002.** Signaling In Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance In *Arabidopsis Thaliana*. *Plant Biol.*4(5):535-544.
 - **Pirlak L.A., Köse. M.B., 2009.** Effects of plant growth promoting rhizobacteria on yield and some fruit properties of strawberry, *J. Plant Nutr.*, 32 (7), 1173-1184.
 - **Polonenko DR, Scher FM, Kloepper JW, Singleton CA, Laliberté EM, Zaleska 1, 1987.** Effects of root colonizing bacteria on nodulation of soybean roots by *Bradyrhizobium japonicum*. *Can J Microbiol*33, 498-503
 - **Prapagdee B., Kuekulvong C. and Mongkolsuk S. 2008.** Antifungal potential of extracellular metabolite produces by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *Int. J. Biol. Sci.* 4, 330-337.
 - **R. Cousin,1997,** " Peas (*Pisum sativum* L.)", *Field Crops Research*, 53, p120
 - **Ramette, A., M. Frapolli, G. Defago, et Y. Moenne-Loccoz. 2003.** Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relation ship with host plant species and HCN synthesis ability. *Mol Plant Microbe Interact.* 16: 525-535

Références bibliographiques

- **Robin. A, Vansuyt. G, Hinsinger. P, Meyer. J. M, Briat J.F, LEMANCEAU. P, 2008.** Iron dynamics in the rhizosphere: consequences for plant health and nutrition. *Adv. Agron.* 99, 183-225.
- **Ryder M. H., Brisbane P. G., Rovira A. D., 1990.** Mechanisms in the biological control of take-all of wheat by rhizosphere bacteria. In: *Biological control of soil borne plant pathogens.* Hornby D., Cook R. J., Henis Y., Eds., CAB. International, Wallingford, Oxford, UK, Chap. 9, 123-130
- **Sakthivel, N., et Gnanamanickam, S.S., 1989,** "Incidence of different biovars of *Pseudomonas fluorescens* in flooded rice rhizospheres of India", *Agriculture, Ecosystem and Environment* 25,287-295.

- **Sana Dhane Fitouri. 2011.** Diversités phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du Sulla du nord (*Hédysarum Coronarium* L.) et sélection de souches rhizobiales efficaces Institut national agronomique de Tunisie - Doctorat en sciences agronomiques.
- **Sawada, H., Kuykendall, L.D., and Young, J.M. 2003,** Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol* 49, 155-179.
- **Saxena, N.P., 1993.** "Selection for drought and salinity tolerance in cool season food legumes", In: Singh, K.B., Saxena, M.C.(eds) *Breeding for stress tolerance in cool season food legumes*, ICARDA/John Wiley and Sons, Chichester, UK, (1993), 245 - 270.
- **Schippers, B., van Eck, W.H. 1981.** Formation survival of chlamydospores in *Fusarium*. In *Fusarium diseases, Biology Taxonomy* (Eds. Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Cook, R.J.), The Pennsylvania State University Press, University Park London.250-260.
- **Schnider-Keel, U. A. Seematter, M. Maurhofer, C. Blumer, B. Duffy, C. Gigot-Bonnefoy, C. Reimann, R. Notz, G. de Fago, D. Haas, et C. Keel. 2000.** Autoinduction of 2,4-Diacetylphloroglucinol Biosynthesis in the Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and Repression by the Bacterial Metabolites Salicylate and Pyoluteorin. *Journal of Bacteriology* 182(5):1215-1225.
- **Schumpp, O., Deakin, W.J., 2010.** How inefficient rhizobia prolong their existence within nodules. *Trends Plant Science* 15 : 189-195.
- **Seneviratne, G., Jayasinghearachchi, H.S., 2003.** Phenolic acids: Possible agents of modifying N₂-fixing symbiosis through rhizobial alteration? *Plant and Soil* 252: 385-395.
- **Sibylla Rometsch, Février, 2009.** *Pisum sativum* subsp. *biflorum* Etude de cas pour une espèce sauvage menacée apparentée à une espèce cultivée, p8
- **Smýkal P, Kenicer G, Flavell AJ, Corander J, Kosterin O, Redden RJ, Ford R, Coyne CJ, Maxted N, Ambrose MJ, Ellis NTH. 2011.** Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources*. 9: 4–18

- **Smýkal Petr , Clarice Coyne, Robert Redden and Nigel Maxted, 2013, "** Peas", Genetic and Genomic Resources of Grain Legume Improvement, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service p41.
- **Sneh, B., M. Dupler, Y. Elad, and R. Baker. 1984.** Chlamyospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumernum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from *Fusarium*-suppressive soils. *Phytopathology* 74:1115-1124.
- **Snyder W.C., et Hansen H.N., 1940,** "The species concept *in fusarium*", *Am. J. Bot*, 27, species and production of increased- growth, 64-67.
- **Soylu, S., Bennett, M.H., And Mansfield, J.W. 2002.** Induction Of Phytoalexin Accumulation In Broad Bean (*Vicia Faba* L.) Cotyledons Following Treatments With Biotic And Abiotic Elicitors. *Turk J. Agric. For.* 26:343-348.
- **Stacey G., Libault M., Brechenmacher L., Wan J., May G.D. 2006.** Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Curr Opin Plant Biol.*
- **Stacey G., Libault M., Brechenmacher L., Wan J., May G.D. 2006.** Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Curr Opin Plant Biol.*
- **Stracke S., Kistner C., Yoshida S., Mulder L., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J., Szczyglowski K., Parniske M. 2002.** A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417, 959-62.
- **Tagoe SO, Horiuchi T, Matsui T., 2008.** Effects of carbonized and dried chicken manures on the growth, yield, and N content of soybean. *Plant Soil.* 306: 211-220.
- **Thakore, Y. 2006.** The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology.* 2(3):294-208.
- **Thomashow, L. S., and D. M. Weller. 1988.** Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of Bacteriology* 170:3499-3508.

- **Toua, D., Benchabane, M., Bensaid, F., et Bakour, R., 2013.** Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of fusarium wilt in tomato and fax, African Journal Microbiology Reseach, vol.7 no. 48.
- **Van Loon, L, C., Bakker, PAHM., Pieterse, C,M,J. 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu Rev Phytopathol, 36:453-483.
- **Vessey, J. K., 2003.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria As Biofertilizers. Plant And Soil, 255(2): 571-586.
- **Waluyo SH, Lie TA, Mannetje L., 2004.** Effect of phosphate on nodule primordia of soybean (*Glycine max*) in acid soils in rhizotron experiments. Ind. J. Agric. Sci. 5: 27-44.
- **Wang, D., Yang, S., Tang, F., Zhu, H., 2012.** Symbiosis specificity in the legume: rhizobial mutualism. Cellular Microbiology 14: 334-342.
- **Whatling, C. A., J. E. Hodgson, M. K. R. Burnham, N. J. Clarke, F. C. H. Franklin, et C. M. Thomas. 1995.** Identification of a 60kb region of the chromosome of *Pseudomonas fluorescens* NCIB 10586 required for the biosynthesis of pseudomonic acid (mupirocin). Microbiology 141:973-982.
- **Whipps, J.M., Turnbull, G.A., Morgan, J.A.W., Saunders, J.R. 2001.** The Role Of Bacterial Motility In The Survival And Spread Of *Pseudomonas Fluorescens* In Soil And In The Attachment And Colonization Of Wheat Roots. FEMS Microbiol Ecol,36:21-31
- **Xu, G. W., and D. C. Gross. 1986.** Selection of fluorescent pseudomonads antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppressive of potato seed piece decay. Phytopathology 76:414-422. Yield And Nutrient Uptake Of Wheat. J Plant Nutrition, 28:2079–2092.
- **Yala, A., 2016.** Essai de biocontrôle de la fusariose vasculaire du petit pois. Mémoire magister, U. Blida 1. 122p.

ANNEXE 1

Milieux de culture

Les milieux sont autoclavés pendant 20 mn à 120°C; ces ingrédients pour 1 litre d'eau distillée.

❖ **Milieu PDA** (Potato-Dextrose-Agar (PDA))

Pomme de terre250g
Glucose20g
Agar.....20g

❖ **Milieu YMA:** Ce milieu (YM ou YMA) est utilisé pour la croissance de la conservation des souches de Rhizobium. Ce milieu contient:

Mannitol.....10g
Na-glutamate0,5g
K₂HPO₄.....0,5g
MgSO₄..... 0,2 g
NaCl0,1g
L'extrait de levure.....1g
FeCl₃..... 4mg
Agar.....20g

❖ **King B** : (King et al., 1954): pH 7,2

K₂HPO₄1,5 g
MgSo₄.7H₂O1,5 g
Glycérol15ml
Peptone20g
Agar20g

❖ **Mixte 1:** (50% PDA+50% KB)

Pomme de terre250g

Glucose20g

K₂HPO₄1,5 g

MgSO₄.7H₂O1,5 g

Glycérol15ml

Peptone20g

Agar20g

❖ **Mixte 2: (50% PDA+50% YMA)**

Pomme de terre250g

Glucose20g

Mannitol.....10g

Na-glutamate0,5g

K₂HPO₄.....0,5g

MgSO₄..... 0,2 g

NaCl0,1g

L'extrait de levure.....1g

FeCl₃..... 4mg

Agar.....20g

ANNEXE2

Tableau de sévérité des génotypes étudiés bactérisés avec les cinq souches rhizobactériennes

Jl1412	7	10	13	16	19	22	25	28	31
Pf F21	1,18	1,42	1,46	1,47	1,48	1,54	1,69	1,98	1,98
Meso	1,21	1,33	1,35	1,52	1,54	1,59	1,71	2,23	2,23
Sino	1,16	1,32	1,35	1,53	1,61	1,74	1,91	2,12	2,12
RL	1,08	1,08	1,11	1,21	1,25	1,38	1,8	2,42	2,42
mutant RL	1,15	1,18	1,26	1,33	1,47	1,57	2,08	2,35	2,35

Messire	7	10	13	16	19	22	25	28	31
Pf F21	1,21	1,22	1,27	1,33	4,41	1,78	2,32	3,04	3,04
Meso	1,15	1,23	1,42	1,47	2,47	2,51	3,01	3,44	3,44
Sino	1,17	1,18	1,23	1,3	2,06	2,49	2,82	3,26	3,26
RL	1	1,03	1,07	1,08	1,36	2,04	2,55	3,32	3,32
mutant RL	1,2	1,24	1,45	1,45	1,87	2,31	2,52	3,2	3,2

Jl1210	7	10	13	16	19	22	25	28	31
Pf F21	1,21	1,27	1,4	1,55	1,66	2,08	2,95	3,33	3,33
Meso	1,05	1,1	1,17	1,23	1,57	1,67	2,08	2,22	2,22
Sino	1	1,05	1,08	1,08	1,14	1,67	1,85	2,27	2,27
RL	1,21	1,38	1,44	1,5	1,6	1,98	2,39	3,08	3,08
mutant RL	1,04	1,07	1,08	1,13	1,74	2,11	2,19	2,77	2,77

P21	7	13	16	19	22	25	25	28	31
Pf F21	3,19	3,33	3,36	3,45	3,5	3,5	3,71	4,13	4,13
Meso	1,48	1,56	2,03	2,34	2,96	3,02	3,44	3,89	3,89
Sino	1,32	1,87	2,22	2,63	3,14	3,34	3,55	3,74	3,74
RL	1,27	1,28	1,51	1,53	1,92	2,61	3,03	3,39	3,39
mutant RL	1,2	1,27	1,5	1,6	1,85	2,59	3,07	3,58	3,58

Kelvedone	7	13	16	19	22	25	25	28	31
Pf F21	1,49	1,79	1,82	1,85	1,99	2,29	2,81	3,78	3,78
Meso	1,32	1,35	1,48	1,51	1,56	1,65	1,7	1,96	1,96
Sino	1,07	1,1	1,11	1,21	1,26	1,49	1,92	2,42	2,42
RL	1,19	1,25	1,5	1,5	3,38	4,21	4,93	5	5
mutant RL	1	1,04	1,07	1,13	1,22	2,17	2,53	3,1	3,1

ANNEXE 3

Tableaux de taux d'infection (%) des génotypes étudiés bactérisé avec les cinq souches rhizobactériennes.

Jl1412	7	10	13	16	19	22	25	28	31
Pf F21	14,29	14,29	17,36	12,50	16,67	16,11	25,00	38,64	38,64
Meso	18,75	16,67	18,64	10,00	18,18	17,42	29,17	46,15	46,15
Sino	12,50	12,50	21,25	16,67	16,67	25,00	37,73	39,02	39,02
RL	12,50	12,50	16,67	10,56	15,00	32,73	47,73	48,11	48,11
mutant RL	4,17	7,14	3,57	12,95	25,00	27,78	27,50	50,00	50,00

Jl1412	7	10	13	16	19	22	25	28	31
Pf F21	14,29	14,29	17,36	12,50	16,67	16,11	25,00	38,64	38,64
Meso	18,75	16,67	18,64	10,00	18,18	17,42	29,17	46,15	46,15
Sino	12,50	12,50	21,25	16,67	16,67	25,00	37,73	39,02	39,02
RL	12,50	12,50	16,67	10,56	15,00	32,73	47,73	48,11	48,11
mutant RL	4,17	7,14	3,57	12,95	25,00	27,78	27,50	50,00	50,00

Jl1210	7	10	13	16	19	22	25	28	31
Pf F21	26,67	20,83	18,33	19,64	10,00	58,33	66,67	75,00	75,00
Meso	22,71	17,92	19,17	19,82	18,06	60,42	65,83	79,17	30,56
Sino	0,00	0,00	0,00	6,25	13,39	22,22	23,61	43,94	43,94
RL	21,43	18,75	22,22	22,22	15,00	36,11	44,44	66,36	66,36
mutant RL	0,00	5,56	5,56	5,56	5,56	38,89	49,21	51,43	51,43

P21	7	10	13	16	19	22	25	28	31
Pf F21	72,73	69,23	66,67	67,86	68,75	71,43	82,14	100,00	100,00
Meso	41,67	37,01	34,17	29,23	57,48	60,92	73,95	92,86	92,86
Sino	16,67	15,00	20,00	28,18	25,76	54,17	58,57	66,43	66,43
RL	35,00	31,82	37,50	34,62	42,31	55,77	64,58	71,64	71,64
mutant RL	19,44	27,69	39,61	45,13	41,67	73,21	66,67	92,31	92,31

Kelvedon	7	10	13	16	19	22	25	28	31
Pf F21	21,11	20,83	25,40	20,83	18,25	39,58	66,67	58,57	100,00
Meso	38,10	33,04	36,51	34,29	29,29	29,17	29,29	36,43	36,43
Sino	21,43	21,43	12,50	7,14	5,56	15,00	16,67	35,42	35,42
RL	18,75	18,75	20,00	16,67	62,50	85,71	88,89	100,00	100,00
mutant RL	0,00	5,56	5,56	5,56	0,00	38,89	49,21	51,43	51,43

Introduction

Données bibliographiques

Matériel et méthodes

Résultats et discussion

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes