



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الأخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : ميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Ecologie et environnement

Spécialité : Ecologie Microbienne

Intitulé :

Mise en évidence de quelques activités biologiques des bactéries nodulaires du pois chiche: réduction d'azote, solubilisation du phosphate et antagonisme anti-pathogénique

Présenté et soutenu par : BOUDIAF Hadjer

Le : 16/07/2019

DRISS Nour El Houda

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mlle ARABET Dallel (M.C.A- UFM Constantine).

Rapporteur : Mr. BENHIZIA Yacine (Professeur - UFM Constantine).

Co-rapporteur : Mlle. DEKKICHE Samia (M.C.B-U.V Batna 2).

Examineurs : Mme. GUERGOURI Ibtissem (M.C.A-UFM Constantine)

Année universitaire
2018 - 2019

Remerciement

Au terme de ce travail, nous remercions Dieu, le tout puissant et miséricordieux qui nous a donné le courage et la patience pour accomplir ce modeste travail

*Nous tenons tout d'abord à exprimer notre profond respect à notre directeur de recherche monsieur **BENHIZIA Yacine**, professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Université Mentouri Constantine, lui qui nous a initié aux valeurs authentiques, qu'il trouve ici le témoignage de notre profonde gratitude.*

*Nos vifs remerciements s'adressent à **Mlle DEKKICHE Samia** enseignante de l'Université Hadj Lakhdar à Batna pour sa patience, ses remarques et pour son aide tout au long de notre période de travail. Sans lesquels ce travail n'aurait pas pu mener au bon port*

Nos remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont accordé à notre travail.

*A **ARABET Dallel** pour son accord d'accepter de présider notre travail.*

*A **Mme GUERGOURI Ibtissem** pour avoir accepté d'examiner cette recherche.*

Merci à vous tous

Dédicace

A mes chers parents qui ont veillé sur moi toute leur vie, a ma chère grand-mère.

A mes sœurs

A mon frère

A mon adorable famille

A mes chers amis qui ont su me rendre le sourire quand je n'avais que des larmes, qui ont su me rendre l'espoir quand j'avais baissé mes armes

A tous ceux qui m'ont aidée, conseillée, contribué à l'élaboration de ce travail, par un conseil donné, un livre prêté ou un mot doux murmuré.

Je dédie ce travail

Nour El Houda

Dédicaces

A ma très chère mère,

*La source de tendance, de patience et de générosité, tu as fait plus qu'une mère
puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs
études*

A mon très cher père

*Celui qui m'a entouré d'amour, rein au monde ne vaut tes efforts fournis jour et
nuit pour notre bien-être*

A mes sœurs et mes frères.

A mes nièces et mes neveux.

A mes chères amis : Sara, Khaoula, Iness, Sara, Chaima, Rami.

*Celles avec qui je trouve mes repères ... C'est grâce à vous que j'avance plus forte
chaque jour.*

A tous ceux qui m'aiment, je dédie ce travail

Hadjer

Résumé

Ayant comme objectif la mise en évidence de l'intérêt des bactéries nodulaires du pois chiche, sur la plante hôte et sur son environnement, cette étude s'est focalisée sur 16 bactéries nodulaires diversifiées en genre et en espèces en testant leur pouvoir sur trois types d'activité biologique. Le pouvoir de transformer l'azote est vérifié via deux tests, mettant en évidence la présence de la nitrate réductase et de la nitrogénase. Le pouvoir de solubilisation du phosphate naturel (phosphate tricalcique) est cherché qualitativement sur trois milieux solides différents et quantitativement sur le milieu liquide NBRIP. L'activité antimicrobienne des bactéries nodulaires est testée contre six bactéries pathogènes par la méthode de disque et contre deux champignons phyto pathogènes par confrontation directe sur milieu gélosé. La plupart des bactéries nodulaires testées ont montré leur capacité de réduire et de fixer l'azote. Six bactéries ont révélé leur pouvoir de solubiliser le phosphate naturel. Trois de ces dernières sélectionnés via leur indice de solubilisation, ont subi un test qualitatif. Le résultat montre que la plus grande quantité du phosphate naturel est libérée pendant le deuxième jour d'incubation pour les trois bactéries testées. Cette solubilisation est accompagnée d'une chute de pH dans le cas de deux bactéries et une stabilité de ce dernier dans le cas de la souche *M.ciceri* qui a enregistré la plus grande quantité de phosphate solubilisé. La plus importante activité antibactérienne et antifongique est montrée par le genre nodulaire *Burkholderia* contre le plus grand nombre de bactéries pathogènes, et contre les deux champignons phytopathogènes utilisés.

Avec ces qualités détectées dans cette étude, ces bactéries nodulaires pourraient être efficaces dans le bio contrôle de divers agents microbiens phytopathogènes ainsi que dans la biofertilisation du sol.

Mots clés : Pois chiche, antagonisme, fixation d'azote, solubilisation.

Summary

With the objective of highlighting the interest of nodular bacteria in chickpea, on the host plant and its environment, this study focused on 16 nodular bacteria diversified in genus and species by testing their power over three types of biological activity. The ability to transform nitrogen is verified via two tests, highlighting the presence of nitrate reductase and nitrogenase. The solubilization capacity of the natural phosphate (tricalcium phosphate) is sought qualitatively on three different solid media and quantitatively on the liquid NBRIP medium. The antimicrobial activity of nodular bacteria is tested against six pathogenic bacteria by the disk method and against two phyto pathogenic fungi by direct comparison on agar medium. Most of the nodular bacteria tested showed their ability to reduce and fix nitrogen. Six bacteria revealed their ability to solubilize phosphate rock. Three of these selected by their solubilization index, have undergone a qualitative test. The result shows that the largest amount of phosphate rock is released during the second day of incubation for the three bacteria tested. This solubilization is accompanied by a drop in pH in the case of two bacteria and a stability of the latter in the case of the strain *M.ciceri* which recorded the largest amount of solubilized phosphate. The most important antibacterial and antifungal activity is shown by the *Burkholderia* nodular genus against the largest number of pathogenic bacteria, and against the two phytopathogenic fungi used.

With these qualities detected in this study, these nodular bacteria could be effective in the bio-control of various phytopathogenic microbial agents as well as in soil biofertilization.

Key words: Chickpea, antagonism, nitrogen fixation, solubilization.

ملخص

نظرا لأهمية البكتيريا العقيدية للحمص على النبات المضيف و بيئته هذه الدراسة تتمركز على 16 بكتيريا متنوعة، تم اختبار قدراتهم في ثلاث وظائف بيولوجية. القدرة على تحويل النيتروجين فحص باختبارين مما سلب الضوء على وجود نترات إنزيم النيتروجاز والنيتروجين. القدرة على إذابة الفوسفات الطبيعي والتي اختبرت في ثلاث وسائط صلبة مختلفة و اخر سائل، بالإضافة الى اختبار النشاط المضاد للميكروبات للبكتيريا العقيدية والتي تم اختبارها ضد ستة بكتيريات ممرضة واثنين من الفطريات. اغلبية البكتيريا المدروسة اثبتت قدرتها على تثبيت النيتروجين، ستة منها قادرة على إذابة الفوسفات الطبيعي و ثلاثة من هذه الاخيرة خضعت لاختبار نوعي مما بين ان اكبر قدرة لإذابة الفوسفات تكون في اليوم الثاني من الحضانة. ان اهم نشاط مضاد للميكروبات الممرضة قدم من طرف البكتيريا *Burkholderia* ضد اكبر عدد من الميكروبات الممرضة.

بهذه الخصائص المهمة تستطيع هذه البكتيريا المختبرة ان تكون فعالة في مكافحة الحيوية ضد عدة ممرضات النباتية بالإضافة الى قدرتها على التسميد الحيوي للتربة.

الكلمات المفتاحية: الحمص ، الخصومة ، تثبيت النيتروجين ، الذوبان.

Table des matières

Introduction	1
Synthèse bibliographique.....	5
I. Les légumineuses.....	7
I.1. Généralité	7
I.2. Classification.....	7
I.3. Intérêt des légumineuses	8
I. 4. Les bactéries associées aux légumineuses	8
II. Le pois chiche	10
II.1. Origine et historique	10
II.2. Classification	10
II.3. Description botanique.....	10
II.4. Propriétés nutritionnelles et intérêts	12
II.5. Types de graines de pois chiche	13
II.6. Exigences culturales	14
II.7. Le phosphore pour la plante	14
II. 8. Les bactéries nodulaires du pois chiche	15
III.Le pois chiche en Algérie	17
III.1. Situation économique	17
III.2. Les facteurs limitant la production du pois chiche en Algérie	18
III.3. Solutions pour augmenter le rendement	19
Matériel et méthodes	21
I. Matériel biologique	23
II. Préparation des cultures des microorganismes	25
II.1. Cas des bactéries nodulaires	25
II.2. Les bactéries non nodulaires	26
II.3. Les champignons phytopathogènes	26
III. Mise en évidence de quelques activités biologiques	26
III.1. Transformation de l'azote	26

III.2. Solubilisation des phosphates	27
IV. Mise en évidence de l'activité antagoniste des bactéries nodulaires vis à vis des microorganismes pathogènes du pois chiche	30
IV.1. l'activité antibactérienne	30
IV.2. L'activité antifongique	30
Résultats et discussion	31
I. Caractères phénotypiques des bactéries utilisées	33
I.1. Les bactéries nodulaires	33
I.2. Les bactéries non nodulaires	34
I.3. Les champignons phytopathogènes	35
II. Mise en évidence des activités biologiques des bactéries nodulaires	35
II.1. Transformation de l'azote	35
II.2. Solubilisation des phosphates	39
III. Mise en évidence de l'antagonisme des bactéries nodulaires vis-à-vis des microorganismes pathogènes du pois chiche	47
III.1. Activité antibactérienne	47
III.2. Activité antifongique	50
Discussion Générale	53
Conclusion	61
Références bibliographiques	64
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau 1 : Valeur nutritionnelle moyenne pour (100 g) de pois chiche.

Tableau 2 : Divers microorganismes utilisés.

Tableau 3 : Propriétés des colonies de différentes souches bactériennes.

Tableau 4 : Caractéristiques des bactéries phytopathogènes.

Tableau 5 : Test de l'activité nitrate réductase.

Tableau 6 : Diamètre de colonie, des halos et de la zone colorée des souches nodulaires.

Tableau 7 : Présence ou absence d'halos selon le milieu de culture.

Tableau 8 : Diamètres des colonies et des halos sur trois milieux de culture.

Tableau 9 : Croissance, pH et quantité de phosphate libre montrés par les souches solubilitrices du phosphate sur milieu liquide

Tableau 10 : Densité optique du phosphate libre obtenu pendant 9jours d'incubation des souches nodulaires.

Tableau 11 : Diamètre des zones d'inhibition obtenues autour des colonies des bactéries nodulaires.

Tableau 12 : Pourcentage d'inhibition bactérienne, diamètre de croissance mycélienne.

Liste des figures

- Figure 1 :** Morphologie du pois chiche (*Cicer arietinum*L).
- Figure 2 :** Types de cultivars de pois chiche (Maheri Sis et al., 2008).
- Figure 3 :** Croissance des bactéries nodulaires.
- Figure 4:** Caractères phénotypiques des champignons.
- Figure 5:** Résultat du test de nitrate réductase sur le milieu TY.
- Figure 6 :** Résultats du test de la nitrogénase.
- Figure 7 :** Diagramme en bâtonnet représentant le diamètre de la zone colorée en fonction de la souche bactérienne.
- Figure 8 :** Apparition des halos sur trois milieux différents.
- Figure 9 :** Diagramme en bâtonnet représentant l'indice de solubilisation (IS) en % des souches solubitrices du phosphate naturel, sur trois milieux de culture solide.
- Figure 10 :** Croissance et pH des souches solubitrices en fonction du temps.
- Figure11 :** Courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction de la concentration du phosphate libre (K_2HPO_4).
- Figure 12 :** Diagramme en bâtonnet représentant la quantité en phosphore libre (mg/l), libérée par souche bactérienne et par jour.
- Figure 13:** Zones d'inhibition des bactéries nodulaires contre la bactérie pathogène.
- Figure 14 :** Diagramme en bâtonnet représentant le diamètre d'inhibitions données par les souches nodulaires en présence de cinq bactéries pathogènes.
- Figure 15:** Croissance du champignon F9.
- Figure 16 :** Pourcentage d'inhibitions des champignons pathogènes par les souches nodulaires

Liste des abréviations et symboles

N₂ : Nitrogène

H₂PO₄⁻ : Dihydrogène phosphate

HPO₄⁻² : Hydrogène phosphate

P : Phosphate

hg : Hectogramme

ha : Hectare

N : Azote

K : Potassium

Introduction

Les légumineuses sont considérées comme un don précieux de la nature. Elles jouent un rôle important dans les balances alimentaires de nombreuses populations humaines en constituant un assesseur alimentaire pour la plupart des pauvres à travers le monde. Les légumineuses constituent une source importante des protéines végétales qui contribue à compenser le déficit en protéines animales (Duranti et Gius, 1997). Elles occupent également une place importante dans l'agriculture et l'économie, sans négliger leur importance écologique qui se manifeste notamment dans l'amélioration de la fertilité des sols grâce à leur capacité de fixer l'azote atmosphérique.

La culture des légumineuses dans le monde se focalise principalement dans le continent asiatique avec un taux de 49%, suivi par la superficie africaine avec 21,68% dont la production est jugée faible, en bas de l'échelle, le continent américain est marqué par le moindre taux de 18,97%. (FAOSTAT, 2013).

En Algérie, seulement 3,3% de sa superficie totale est exploitée pour la production agricole (FAOSTAT, 2014). Cette activité agricole se localise dans la zone pluvieuse du nord, d'une autre part, une croissance démographique rapide est y marquée dernièrement; deux raisons suffisantes pour entraîner de grandes pressions dans les ressources de la terre, surtout celles à profil agricole.

L'une des plus importantes légumineuses à graines en Algérie est le pois chiche (*Cicer arietinum* L.), un légume qui occupe la deuxième position après la fève. Sa culture a connue depuis l'indépendance une évolution progressive sur le plan des superficies et dans la consommation, mais une régression dans la productivité. Les causes d'ordre agro-technique de cette régression, sont souvent discutées alors que les causes symbiotiques sont beaucoup plus négligées (Hamadache et Ait Abdallah, 1998).

Afin de combler ce déficit de production en pois chiche et de satisfaire les besoins de la population algérienne, des efforts importants des cultivateurs et des responsables de l'agriculture ont permis une augmentation remarquable en rendement, 25497 hg/ha en 2015, 22961hg/ha en 2016 et 28553hg/ha en 2017 (FAOSTAT, 2017). Cette amélioration a été

obtenue au prix d'une augmentation de la surface de culture et d'une utilisation des semences d'hivers moins coûteuses. Malgré tous ces efforts, le rendement du pois chiche est toujours insuffisant par rapport aux besoins du pays, ce problème devrait être traité par d'autres solutions innovantes (FAOSTAT, 2017).

L'inoculation des légumineuses par des rhizobias efficaces est devenue un moyen efficace et pratique pour un bon enrichissement de sols pauvres en azote. Actuellement, l'inoculation est appliquée dans plusieurs pays, notamment au Brésil où l'inoculation du soja (*Glycine max L.*) permet une grande économie d'engrais azotés (Santos *et al.*, 2006). Malheureusement en Algérie, l'inoculation est peu connue et n'est utilisée qu'à titre expérimental.

La symbiose *Rhizobium*-Légumineuse fournit chaque année, à l'échelle de la planète, une quantité d'azote équivalente à celle synthétisée par voie chimique dans l'industrie des engrais, (Sebihi, 2008). Ainsi, il est estimé que 80% d'azote des plantes légumineuses pourrait être assuré par la flore symbiotique nodulaire (FSN), (Larue et Patterson, 1981) à l'intérieur de petites excroissances appelées nodules, ou nodosités.

Récemment, des études sur les bactéries nodulaires du pois chiche ont mis en évidence, en plus du genre *Mesorhizobium*, spécifique de cette légumineuse (Nour *et al.*, 1994), la présence du genre *Burkholderia*, et en plus des rhizobiums eux même, des bactéries non rhizobiums étaient présentes dans les nodules (Dekkiche *et al.*, 2017). Cette importante diversité et hétérogénéité en type bactérien nodulaire entre rhizobium et non rhizobium ouvre la porte à plusieurs questions, ciblant notamment le rôle exacte de chacun de ces bactéries dans les nodules du pois chiche.

L'objectif de cette étude vise à examiner quelques caractéristiques de certaines bactéries nodulaires du pois chiche, dérivantes de leurs activités biologiques. Dans ce contexte, des tests sont réalisés pour mettre en évidence la capacité de ces bactéries à fixer l'azote, à solubiliser le phosphate inorganique, à protéger les graines de pois chiche contre certaines bactéries pathogènes et à mettre en évidence la capacité antifongique.

Pour donner à cette étude un aspect plus scientifique, le présent travail est divisé en trois grandes parties : une partie bibliographique traitant les principales parties ciblées dans les manipulations réalisées. Une partie « Matériel et méthodes » qui explique les préparations et

les tests réalisés, enfin la troisième partie qui expose les résultats obtenus suivis par leur discussions, une conclusion et des perspectives soulignés.

Synthèse bibliographique

I. Les légumineuses

I.1. Généralité

Les légumineuses autrement dit fabacées, constituent la troisième super famille par ordre d'importance chez les Angiospermes avec près de 20000 espèces réparties dans 800 genres (Petr Smýkal *et al.*, 2015). Ces plantes sont des dicotylédones à fleur dont le fruit est une gousse.

De nombreuses légumineuses constituent une source majeure de protéines et d'huiles végétales (Graham et Vance, 2003). Il s'agit d'une famille qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles aussi bien à l'homme (haricot, pois, fève ...) qu'à l'animal (soja, luzerne ...), c'est la raison pour laquelle elles sont largement cultivées sur une importante surface de la planète.

I.2. Classification

Les *Fabaceae* sont divisées en trois sous-familles, selon une classification basée sur leur forme florale. Deux sont monophylétiques (*Papilionoideae*, *Mimosoideae*) et la troisième est paraphylétique (*Caesalpinoideae*) (Guignard et Dupont, 2005).

- La sous-famille des *Caesalpinoideae*, comprenant environ 150 genres et 2200 espèces, rassemble principalement des arbres ou des arbustes retrouvés en régions tropicales et subtropicales (Crété, 1965).
- La sous-famille des *Mimosoideae* rassemble surtout des arbres et des arbustes des régions tropicales et subtropicales. Cette sous-famille possède plus d'une soixantaine de genres et environ 2500 espèces (Crété, 1965).
- Enfin, la sous-famille monophylétique des *Papilionoideae* renferme plus de deux tiers des espèces et inclut presque toutes les légumineuses économiquement importantes. Elle représente la plus grande sous-famille avec 476 genres et environ 14000 espèces (Doyle et Luckow, 2003). Les plantes de cette sous-famille sont principalement des herbes, elle comprend aussi des arbres et des arbustes, présents en régions tempérées et tropicales (Crété, 1965).

I.3. Intérêt des légumineuses

1.3.1. La symbiose fixatrice d'azote

La symbiose rhizobium-légumineuse est le résultat de l'interaction complexe entre la bactérie et son hôte suite à un dialogue moléculaire entre les deux partenaires. Le rhizobium infecte les racines des légumineuses et donne naissance à des excroissances de type tumoral appelées « nodosités ». A l'intérieur de ces nodules, les rhizobiums se différencient et fixent l'azote libre de l'air (sous forme de di azote N₂) et le fournissent à la plante sous une forme assimilable, contre une nutrition carbonée et une niche écologique (Raven *et al.*, 2000).

Le grand intérêt des légumineuses provient en premier lieu de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote. On estime que la réduction biologique de l'azote atmosphérique N₂ en ammonium fournit environ 65% de l'azote disponible dans la biosphère (Lodwig *et al.*, 2003).

1.3.2. Autres intérêts

Les graines de légumineuses jouent un rôle important dans le domaine médical, elles constituent une source de protéine idéale, de fibres solubles, de glucides et de micronutriments (fer, potassium, calcium...) mais pauvres en graisse. Dans l'industrie, les légumineuses représentent une source de matière première pour la production des produits pharmaceutiques et cosmétiques, elles aident également à la restauration des soles dégradées, facilitant l'implantation d'autres espèces végétales (Inra).

I. 4. Les bactéries associées aux légumineuses

I.4.1. Les rhizobias

Rhizobia ou rhizobium, est un terme qui est donné aux bactéries du sol qui sont capables d'induire des nodules sur les racines des légumineuse et d'y fixer l'azote atmosphérique en symbiose (Zakhia et de Lajudie, 2006). Ce terme est substitué par les BNL (Bactéries Nodulant les Légumineuse) (Zakhia *et al.*, 2004).

Les rhizobia comportent 98 espèces réparties en 13 genres (Weir B.S, 2016). Tous classés dans les protéobactéries, la plupart appartiennent à la subdivision alpha protéobactéries (*Rhizobium*, *Sinorhizobium* ou *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Allorhizobium*,

Azorhizobium, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Blastobacter*, *Devosia* ...), alors que certains Rhizobia ont été découverts dans la subdivision des bêta protéobactéries (Young, 1996). D'autres études auraient également identifié la présence de protéobactéries de la subdivision gamma dans les nodules des légumineuses (Benhizia *et al.*, 2004).

1.4.2. Les bactéries PGPR

Lorsque les bactéries contribuent à la croissance des plantes, elles sont appelées : PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper *et al.*, 2004).

L'exemple le mieux connu de ces PGPR est celui des bactéries rhizosphériques stimulatrices de la croissance des plantes (Vacheron, 2013). Ces rhizobactéries colonisent la rhizosphère en utilisant les exsudats racinaires comme substrats nutritifs. A la différence des autres bactéries rhizosphériques, les bactéries PGPR ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante via une multitude de mécanismes (Vacheron *et al.*, 2013).

Par leur action enzymatique, elles solubilisent les éléments nutritifs présents dans les réserves organiques et minérales du sol tels que : le phosphate, l'azote et le fer, et les mettent à la disposition de la plante sous forme d'ions minéraux assimilables à des taux qui correspondent à ses besoins. En plus de leur capacité d'augmenter la production des phytohormones et de fixer l'azote atmosphérique, ces rhizobactéries influencent également le métabolisme de la plante en fournissant les substances qui sont habituellement en quantité limitée dans le sol, (Bashan *et al.*, 2008). Elles peuvent augmenter la tolérance des plantes à divers stress tels les pesticides et le stress hydrique y compris la sécheresse (Cohen *et al.*, 2009).

II. Le pois chiche

II.1. Origine et historique

Le pois chiche est originaire du Moyen-Orient, plus précisément du sud-est de la Turquie et de la Syrie (Singh, 1997). Après avoir traversé de nombreux pays il est devenu disponible dans les côtes du bassin méditerranéen. Ce légume sec connu depuis l'Antiquité (3000 ans av. J.-C.) a été introduit et cultivé en Europe par les croisés qui l'ont découvert au Moyen-Orient.

Les Phéniciens l'ont aussi importé et cultivé au Sud de l'Europe. En passant par l'Afghanistan, le pois chiche est arrivé en Inde il y'a environ deux siècles (Gastronomic).

Chez nous et généralement en Afrique du Nord, le pois chiche se nomme « ikiker » en langue Tamazight; il est connu et cultivé il y'a environ 5000 ans, avant l'arrivée des Phéniciens, (Ikonet).

II.2. Classification

Selon (USDA, 2008), le pois chiche est classifié comme suit :

Règne	Plantae
Sous règne	Tracheobionta (plantes vasculaires)
Embranchement	Spermatophyta (plantes à graines)
Sous embranchement	magnoliophyta (=angiospermes, phanérogames ou plantes à fleurs)
Classe	magnoliopsida (ou dicotylédones)
Sous-classe	rosidae
Ordre	fabales
Famille	Fabaceae (= fabacées, papilionacées ou légumineuses)
Genre	<i>Cicer</i>
Espèce	<i>Cicer arietinum L.</i>

II.3. Description botanique

Le pois chiche (Figure 1) est une plante annuelle, herbacée avec des branches diffusées et propagées. C'est une espèce diploïde ($2n=16$ chromosomes), pouvant atteindre 100 cm de hauteur. Ses racines peuvent atteindre 2 mètres de profondeur, munies de nodules abritant des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique (Muehlbauer et Rajesh, 2008).

Sa tige anguleuse a une hauteur entre 0.20 et 1 mètre. Ses feuilles se composent de 7 à 17 folioles ovales et dentées. Ses fleurs peuvent être blanches, bleues ou violettes; solitaires et pédonculées. Ses gousses sont renflées de 1 à 2 graines presque rondes. Le poids de 1000 grains varie entre 200 et 600 grammes (Vander, 1972).

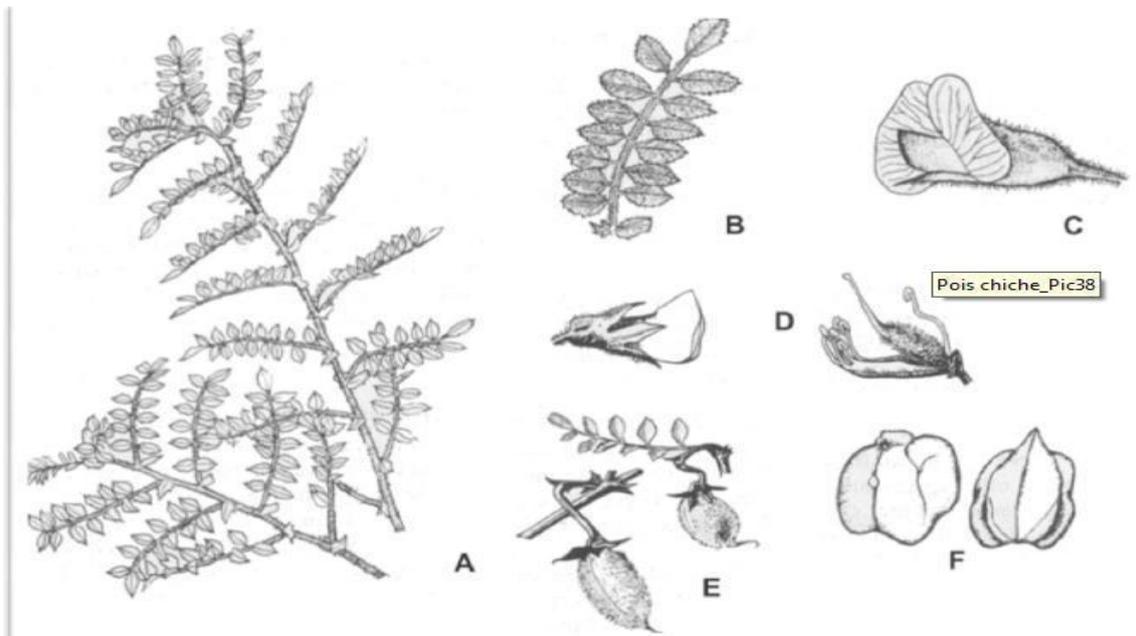


Figure 1 : Morphologie du pois chiche (*Cicer arietinum* L.).

A : tige feuille, **B :** feuille composée de 16 folioles, **C :** fleur zygomorphe, **D :** étamines, pistil et ovaire, **E :** gousses en développement, **F :** graines (Zohary et Hopf, 1988).

II.4. Propriétés nutritionnelles et intérêts

Le pois chiche constitue une source très importante de protéines végétales qui peut corriger le déficit en protéines animales, car il constitue un excellent substitut de la viande, il est riche en sels minéraux, notamment le calcium, le fer, le phosphore et le magnésium et il est faible en matière grasse (Ben Mbarek *et al.*, 2009).

Le pois chiche offre également des glucides, des fibres alimentaires et des vitamines (A, B1, B2 et B9 etc) (Tableau 1) qui jouent un rôle important dans l'alimentation. Il est aussi associé à la prévention des maladies cardiovasculaires, à la gestion du diabète et à l'abaissement des taux de cholestérol (O'Neil *et al.*, 2014).

Tableau 1: Valeur nutritionnelle moyenne pour (100 g) de pois chiche (Ciquel, 2013 in Boukraâ, 2016)

Composés	Quantité	Composés	Quantité
Apport énergétique	15,5g	Arginine	1480mg
Fibres alimentaires	15,5g	Histidine	530mg
Protides	18,6g	Provitamine A	0,180mg
Eau	8,77g	Vitamine B1	0,518mg
Cendre totales	2,94g	Vitamine B2	0,134mg
Glucides	44,3g	Vitamine B9	0,340mg
Amidon	41,89g	Vitamine C	5,1mg
Sucres	2, 41g	Vitamine K	0,264mg
Lipides	5,92g	Calcium	124mg
Acide linoléique	2593mg	Chlore	80mg

II.5. Types de graines de pois chiche

On compte plus de 20.000 variétés de pois chiche dans le monde, qui se divisent en deux grands types de graines « Desi et Kabuli » (Figure2) et un autre moins fréquent qui est le type «Gulabi» :

- ❖ Le type Desi : Il se caractérise par des graines assez petites, ridées, de couleur brune plus ou moins foncée. Ce type de pois chiche est cultivé surtout en Asie en représentant 85 % de la production indienne.
- ❖ Le type Kabuli : Ses graines sont moyennes à assez grandes, jusqu'à deux fois la taille d'un pois, moins ridées que le type Desi, de couleur blanc-crème. Ce type est cultivé surtout dans le bassin méditerranéen.
- ❖ Le type Gulabi est généralement de couleur blanc-crème, sans tanins, comme le Kabuli, mais plus petit et presque lisse, le bec typique du pois chiche est très réduit, ce qui une fois décortiqué, le fait ressembler à un pois jaune (Terresunivia).

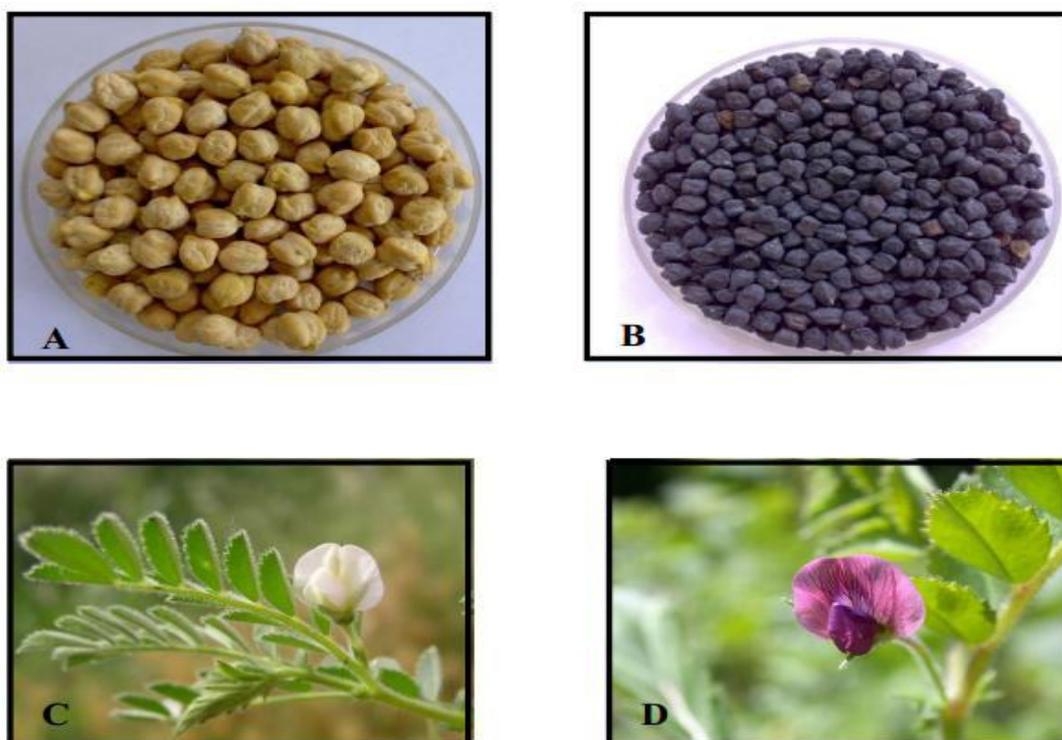


Figure 2 : Types de cultivars de pois chiche (Maheri Sis *et al.*, 2008).

A : Grains de Pois chiche de type Kabuli.

B : Grains de Pois chiche de type Desi.

C : Fleur de pois chiche de type Kabuli.

D : Fleur de pois chiche de type Desi.

II.6. Exigences culturales

La culture du pois chiche, préfère les sols profonds, plus ou moins argileux, dont le pH est neutre ou alcalin, entre 7,3 et 8,2 (Berger *et al.*, 2003). Elle exige la présence du phosphore qui favorise le développement des racines au cours de la végétation ainsi que la présence du potassium qui favorise la formation des graines des fruits et qui existe dans la solution du sol en très petite quantité (ITGC., 2003). Le pois chiche assure une partie de sa nutrition azotée grâce à la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique (Allali *et al.*, 2007). Selon Wery (1990), une consommation en eau de 100 à 150mm confirme que le pois chiche est doté de bonnes capacités pour extraire l'eau stockée dans le sol, quel que soit le type de culture ou le type de pois chiche (Dési ou Kabuli).

La température exerce une forte influence sur les phases végétatives et reproductrices du pois chiche (Summerfield *et al.*, 1979). Ce dernier exige une chaleur dont la température minimale pour la germination est de 5°C et la Température optimale de 18-32°C pour la croissance (Kechache, 2005).

Le pois chiche est considéré comme étant une plante de jours longs (Summerfield *et al.*, 1979). L'intensité de la lumière et de la durée d'éclairement sont des facteurs importants pour la nodulation, la fixation d'azote et la floraison (Lie, 1971 in Beddar, 1990).

II.7. Le phosphore pour la plante

Le phosphore est le deuxième macronutriment majeur requis pour la croissance et le développement des plantes (Vance, 2001). Il existe sous deux formes principales (minérales et organiques). Aux différents niveaux du pH des sols agricoles, le phosphore existe sous ces formes monovalentes (H_2PO_4^-) ou divalente (HPO_4^{2-}) qui sont facilement absorbées par les plantes (Morel *et al.*, 2000).

Le phosphore (P), joue un rôle essentiel dans le transfert d'énergie nécessaire à la croissance et l'amélioration de la productivité des plantes (Giroux, 2002). Il permet la formation correcte des graines et accélère leur maturation. En effet, la disponibilité du P est l'un des déterminants les plus importants de la croissance des légumineuses (Kouas *et al.*, 2009) et sa carence limite la production végétale dans de nombreux sols (Vance *et al.*, 2003).

L'application du phosphore améliore considérablement le rendement en graines, le développement des racines, l'augmentation de la surface photosynthétique et donc plus d'accumulation de matière sèche (Aslam *et al.*, 2010).

II. 8. Les bactéries nodulaires du pois chiche

II. 8. 1. Les partenaires rhizobiums

II. 8.1.1. Partenaire symbiotique spécifique du pois chiche : Le genre *Mesorhizobium*

Les études de Jarvis *et al.*, (1997), ont permis de décrire le genre *Mesorhizobium* dans lequel la première espèce *Mesorhizobium lotie* est incluse. Plus tard, plusieurs autres espèces sont transférées à ce genre, parmi lesquelles les deux espèces *M.ciceri* et *M.mediterraneum*, qui sont connues comme symbiotes spécifiques du pois chiche (Nour *et al.*, 1995).

Actuellement, le genre *Mesorhizobium* est composé d'un total de 43 espèces isolé à partir des nodules des légumineuses. Des études récentes montrent que le pois chiche est capable d'établir des symbioses avec plusieurs espèces de *Mesorhizobium*. En effet, les espèces : *M. amorphae*, *M. loti*, *M.huakuii*, *M.opportunistum*, *M. muleienseet* *M. tianshanense*, sont aptes de former des nodules fonctionnels sur les racines de cette légumineuse (Dekkiche, 2017).

II. 8.1.2. Partenaires symbiotiques non spécifiques

II. 8.1.2.1. Le genre *Burkholderia*

Le genre *Burkholderia* est découvert par le pathologiste botanique Américain Walter E. Burkholder, d'où il tire son nom. La première espèce bactérienne typique de ce genre a été initialement nommée *Pseudomonas cepacia*. Tout comme le genre *Pseudomonas*, les bactéries *Burkholderia* sont aussi de Gram négatif mais elles sont associées plutôt au groupe des B-protéobacteries. A ce temps-là, on compte plus de 45 espèces appartenant à ce genre dont certains sont pathogènes humains importants (Stoyanova *et al.*, 2007). Chez les plantes, certaines *Burkholderiaceae* peuvent être soit pathogènes ou symbiotiques (Venturi *et al.*, 2004). Les diverses espèces de *Burkholderia* peuvent donc être utilisées comme agent de

biocontrôle, dans les processus de bioremédiation et comme stimulant pour la croissance des plantes (symbiose) (Chiarini *et al.*, 2006).

II. 8.1.2.2. Le genre *Ensifer*

Le genre *Ensifer* est décrit par Casida en 1982, alors que le genre *Sinorhizobium* est décrit par Chen *et al.* en 1988. En effet, des études récentes ont montré que ces deux genres appartiennent à un seul taxon. Selon les règles du code bactériologique (révision de 1990) du Comité International de Systématique des Procaryotes (ICSP), l'ancien nom (*Ensifer*) est prioritaire. Ce genre appartient à la classe des α -proteobacteriacea (Young, 2003), il comprend actuellement 17 espèces, dont certains sont identifiées, citant : *E. fredii* et *E. xingianense* (Chen *et al.*, 1988), *E. americanum* (Toledo *et al.*, 2003) et *E. medicae* (Reeve *et al.*, 2010).

Au niveau du grand Maghreb, des études portées sur les symbiotes du pois chiche montrent que le genre *Ensifer* existe parmi les symbiotes de cette légumineuse. Concernant l'Algérie, ce genre est le microsymbiote principale du pois chiche (Dekkiche *et al.*, 2017).

II. 8.1.2.3. Le genre *Rhizobium*

Avant, le genre *Rhizobium* regroupait tous les rhizobias, puis certaines espèces ont été rattachées à de nouveaux genres suite à des analyses phylogénétiques. Le genre *Rhizobium* regroupe des bactéries dites à croissance rapide (temps de génération inférieur à six heures) qui sont mobiles avec des flagelles polaires ou péritriches (4 à 6), aérobies, chimio-organotrophes (De Lajudie *et al.*, 1994) et qui ne forment pas d'endospores.

Ce genre appartient à la classe des α -proteobacteriacea et comporte quatre espèces définies : *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium galegae* (Lindstrom, 1989), *Rhizobium tropici* (Martinez-Romero *et al.*, 1991), et *Rhizobium etli* (Segovia *et al.*, 1992).

Ensuite, des études ont assisté à une croissance vertigineuse d'identification d'espèces, et ont permis d'affilier à ce genre : *Rhizobium tropici* (Martinez-Romero *et al.*, 1991), *Rhizobium etli* (Segovia *et al.*, 1992), *Rhizobium gallicum*, *Rhizobium giardinii* (Amarger *et al.*, 1997), *Rhizobium hainanense* (Chen *et al.*, 1997), *Rhizobium mongolense* (Van Berkum *et al.*, 1988), *Rhizobium undicola* (De Lajudie *et al.*, 1998), *Rhizobium huautlense* (Wang *et al.*, 1998).

al.,1998), *Rhizobium daejeonense* (Quan *et al.*, 2005), *Rhizobium lusitanum* (Valverde *et al.*,2006), et *Rhizobium zea* (Celador *et al.*, 2017).

II. 8.2. Les non Rhizobias

En plus des rhizobiums qui sont responsables de la nodulation et la fixation d'azote atmosphérique chez les légumineuses, il existe encore d'autres bactéries endophytes, au niveau des nodules, appelées bactéries non-rhizobiums (Busby *et al.*, 2016).

Certaines bactéries non rhizobiennes s'avèrent bénéfiques pour leurs légumineuses hôtes car elles améliorent la croissance des plantes par la production des hormones végétales, la fixation d'azote atmosphérique et par la solubilisation du phosphate (Peix *et al.*, 2015).

Néanmoins, ces bactéries non rhizobiennes ont été négligées dans le passé lors de l'isolement de rhizobiums à partir des légumineuses. Ce qui a conduit à un manque d'informations sur la véritable diversité des bactéries non-rhizobium coexistant avec les rhizobiums dans les nodules. Le manque d'informations touche aussi le rôle exact des non rhizobia dans les nodules, ce qui ouvre un large domaine de recherche pouvant donner des résultats importants pour au moins améliorer le rendement des cultures des légumineuses notamment celles du pois chiche.

III. Le pois chiche en Algérie

III.1. Situation économique

En Algérie la culture du pois chiche est localisée surtout dans les régions du nord du pays et limitée au type Kabuli, elle occupe la deuxième place après la fève.

Depuis l'indépendance jusqu'à l'année 2015, la plus grande quantité du pois chiche produite en Algérie est représentée par 35118 tonnes obtenue sur une surface de 33295 ha pendant l'année 2014. En 2015, même si une légère augmentation en rendement (10690 hg/ha) est remarquée, en le cultivant sur une surface plus petite (29000ha) que celle de l'année 2014, la quantité du pois chiche obtenue est réduite pour atteindre la valeur de 31000 tonnes (FAOSTAT, 2017).

La production nationale pour cette légumineuse ne parvient pas à couvrir les besoins internes du pays, ce rendement non satisfaisant est obtenu malgré les efforts fournis par le

gouvernement et les agriculteurs portant, d'une part, sur l'augmentation de la quantité de graines semées et d'une autre part sur l'étalement de cette culture sur des surfaces plus importantes. Une telle situation a incité l'Etat à recourir des importations importantes. En effet, en 2013 l'Algérie a importé une quantité de 108956 tonnes contre une faible quantité de 22 tonnes qu'elle a pu exporter (FAOSTAT, 2016).

III.2. Les facteurs limitant la production du pois chiche en Algérie

Le développement de la culture du pois chiche a révélé plusieurs contraintes, provoquant des dommages plus ou moins importants, il faut citer l'introduction de cultivars sélectionnés parfois à partir de germoplasmes étrangers jugés à haut rendement. Ces cultivars introduits ne peuvent pas établir une bonne symbiose avec les populations rhizobiennes, ce qui engendre une mal nutrition azotée et conduit de façon inattendue à une réduction de la production.

Hamadache et Kheddam (1999) et Djenni (2003) ont rapporté que les causes de la faiblesse de la productivité du pois chiche en Algérie sont souvent d'un côté d'ordre agro-technique, liées aux conditions de semis (Période, mauvaise qualité de semences et modes de semis) et d'un autre côté sont la conséquence de certains facteurs biotiques tels que les adventices, les insectes, les nématodes et les maladies.

Les maladies les plus importantes sont causées par des bio-agresseurs. Plus de 172 agents pathogènes peuvent affecter la culture du pois chiche, parmi lesquels, les maladies fongiques qui sont considérées comme les plus importantes. La nature et l'importance des maladies fongiques varient selon les sites géographiques, les conditions climatiques de l'année et le stade végétatif des plantes. En général, en Algérie, la distribution et l'importance des agents pathogènes restent mal connues (Bouznad *et al.*, 1996).

III.3. Solutions pour augmenter le rendement

III.3.1. Solution agro-technique

Le choix de la variété du pois chiche, ainsi que du sol affecte directement le rendement, le pois chiche s'adapte aux sols assez lourds, à condition qu'ils soient bien drainés. Comme pour

les autres cultures, sa productivité sera plus faible dans les sols peu fertiles. De plus, il faut un minimum de passages utilisant les outils à dents dont l'objectif est de laisser un sol souple et légèrement motteux.

Le pois chiche d'hiver peut avoir une place importante dans les systèmes de culture des zones semi-arides. Un gain de rendement allant du simple au double et même au triple dans certains cas, par rapport à la culture traditionnelle du pois chiche du printemps. Ce gain de rendement est dû principalement à une meilleure utilisation des eaux de pluies, généralement perdues par l'évaporation entre les mois de Novembre et Mars pour la culture du printemps, cela réduit les risques d'un déficit hydrique en fin de cycle (Fellah-trade).

III.3.2. Fertilisation chimique

En vue d'augmenter le rendement des cultures, une fertilisation chimique est administrée, cette dernière consiste à apporter à la plante des engrais chimiques (ou minéraux), permettent d'obtenir, par synthèse, les divers éléments nécessaires pour le développement des plantes, notamment l'azote (N), le phosphore (P) et le potassium (K), sous des formes solubles et directement assimilables par les plantes, à condition qu'ils soient utilisés en doses modérées et seulement aux moments stratégiques.

Il est à noter que lors de l'utilisation massive, ces engrais peuvent provoquer la pollution des sols et sous-sols, notamment les nappes phréatiques qui sont des principaux réservoirs d'eau potable pour l'homme, ce qui entraîne dans certains cas de graves risques sanitaire (Futura-sciences).

III.3.3. Solution biologique

L'inoculation des légumineuses par des rhizobias, joue un rôle important dans l'améliorer du rendement et du stock azoté du sol. Actuellement, l'inoculation est appliquée dans plusieurs pays, notamment au Kenya, des études indiquent que l'inoculation du soja par les rhizobias ont respectivement augmenté les rendements des cultures de cette plante de 40%, 60% et 54% dans les régions d'Homabay, de Kabete et de Mtwapa, sans l'utilisation d'engrais (Notre-planete.info).Malheureusement, l'inoculation est peu connue en Algérie, et n'est utilisée qu'à titre expérimental.

L'utilisation de certains micro-organismes aide à lutter contre les maladies des cultures, à titre d'exemple pour réduire les population des insectes ravageurs, on utilise leur ennemis naturels qui sont soit des prédateurs, soit des parasites ou des agents pathogènes (Sanon *et al.*, 1999). Selon Starnes *et al.*, 1993, plus d'une centaine de bactéries sont considérées comme un moyen de lutte biologique. Ces bactéries appartiennent à trois grandes familles qui sont les Bacillaceae, Enterobacteriaceae et Pseudomonaceae (Greathead *et al.*, 1994).

La lutte biologique parles produits naturels d'origine végétale comme des poudres minérales des huiles végétales, huiles essentielles...etc, issue du phénomène de la phytothérapie, peut également réduire les besoins en pesticides et diminue les impacts environnementaux des cultures.

Matériel et méthodes

I. Matériel biologique

Les microorganismes utilisés sont diversifiés entre bactéries nodulaires (isolées à partir des nodules de pois chiche), bactéries non nodulaires (cliniques et phytopathogènes) et des champignons phytopathogènes (Tableau 2). La majorité de ces microorganismes proviennent des collections microbiennes présentes au niveau du laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, située à l'université des frères Mentouri 1, Constantine. Trois bactéries sont obtenues à partir du centre hospitalier de Batna (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) et trois autres bactéries proviennent du centre hospitalier de Constantine (*Citrobacter*, *Morganella* et *Proteus*.).

Tableau 2: Divers microorganismes utilisés

Micro-organisme	Symboles utilisés	Nom	Genre et espèce	Origine
Bactéries nodulaires	1	B10 (11A-1)	<i>Burkholderia terricola</i>	Jijel
	2	B6 (129)	<i>Burkholderiaceae bacterium</i>	Jijel
	3	B3 (110)	<i>Burkholderia terricola</i>	Jijel
	4	R8 (Sam64-2)	<i>Pantae calida</i>	N'Gaous
	5	R6 (DS75)	<i>Rhizobium giardinii</i> H 152	Merouana
	6	R7 (64-1)	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	N'Gaous
	7	B1 (11A-2)	<i>Burkholderia terricola</i>	Jijel
	8	R9 (26-1)	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	Merouana
	9	M8 (Sam 154)	<i>Pantae agglomerans</i>	Jijel
	10	B5 (111D)	<i>Sodalis paraecaptivus</i>	Jijel
	11	B2 (Sam 36)	<i>Burkholderiaceae bacterium</i>	Jijel
	12	B7 (111B)	<i>Burkholderia terricola</i>	Jijel
	13	B9 (111S)	<i>Burkholderia terricola</i>	Jijel
	14	B11 (129-1)	<i>Burkholderiaceae</i>	Jijel

			<i>bacterium</i>	
	15	M2 (144)	<i>M.ciceri</i>	Jijel
	16	R2 (DS 48)	<i>Ensifer meliloti 2011</i>	Tébessa
Bactéries non nodulaires		ATCC25923 (ST)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Batna
		ATCC35218 (E. coli)	<i>Escherichia coli</i>	Batna
		Citrobacter	Citrobacter	Constantine
		Morganella	Morganella	Constantine
		ATCC15442 (PS)	<i>Pseudomonas aeruginose</i>	Batna
		Proteus	Proteus	Constantine
		P 3	<i>Pseudomonas japonica</i>	Constantine
		P 12	<i>Bcillus amylolitique faciens</i>	Constantine
		P 14	<i>Pantoea sp</i>	Constantine
Champignons Phytopathogènes		F9	<i>Fusarium redolens</i>	Constantine
		F11	<i>Alternaria graminicola</i>	Constantine

II. Préparation des cultures des microorganismes

II.1. Cas des bactéries nodulaires

Les souches nodulaires en question étaient conservées à -80°C dans le glycérol 20%. Pour les réactiver, un repiquage par striation est réalisé dans des boîtes de Pétri contenant le milieu Yeast Extract Mannitol modifié (YEM) gélosé (VINCENT, 1970), (Annexe I), l'incubation est faite à 28°C pendant 5 à 7 jours. Les cultures liquides sont préparées à partir des colonies pures, dans des tubes à essai contenant le milieu YMB liquide stérile. Elles sont incubées à 28°C pendant 2 à 5 jours.

II.2. Les bactéries non nodulaires

Les bactéries non nodulaires, nous ont été donné sur boites gélosées. Un repiquage sur la gélose nutritive (GN), (Annexe I) est réalisé par striation. Les cultures liquides sont préparées à partir des colonies pures, dans des tubes à essai contenant le bouillon nutritif (BN) stérile. Le tout est incubé par suite à 25 °C pendant 24h.

II.3. Les champignons phytopathogènes

A partir des cultures obtenues sous forme de colonies sur boites gélosées, des pastilles de champignons sont transférées stérilement, dans des boites de Pétri contenant le milieu PDA. Les boites sont incubées pendant 7 jours à 30 °C.

III. Mise en évidence de quelques activités biologiques

III.1. Transformation de l'azote

Pour mettre en évidence la capacité des bactéries nodulaires à fixer l'azote, deux méthodes sont utilisées, une sur milieu liquide et l'autre sur milieu solide.

III.1.1. Test sur milieu liquide : Recherche de l'activité nitrate réductase (Beringer, 1974)

L'activité nitrate réductase est mise en évidence sur milieu liquide Tryptone-Yeast (TY), (Annexe I) (Beringer, 1974), contenant 0,1% de KNO (p/v). Des tubes contenant 8 ml du milieu de culture liquide (TY) sont ensemencés chacun par de 25µl d'une culture bactérienne fraîche de chaque bactérie nodulaire. Les tubes sont incubés pendant 4 jours à 28 ± 2°C sous agitation de 150 rpm.

La révélation est réalisée par addition des réactifs de nitrate réductase 1 (Acide sulfanilique dans l'acide acétique 5M), et de nitrate réductase 2 (a-naphtylamine dans l'acide acétique 5M). L'apparition d'une coloration rouge indique que les nitrates ont été réduits en nitrites.

Un résultat négatif nécessite l'addition d'une poudre de zinc métallique et on observe après quelques minutes la coloration obtenue. Si le milieu ne change pas de coloration, nous pouvons dire que la bactérie possède l'enzyme nitrate réductase (Beringer, 1974).

III.1.2. Test sur milieu solide NFMM (Herman et al, 1994).

La détection visuelle de la fixation d'azote des bactéries à tester est cherchée sur le milieu Nitrogène-Free- Malate- Mannitol-Medium (NF-MM), (Annexe I). Ce milieu contient du Bleu de Bromotymol (BTB) comme indicateur de pH. Les bactéries à tester sont ensemencées par striation sur ce milieu. Pour chacune des bactéries testées, un ensemencement d'un inoculum en phase exponentielle ($D_{0.5} > 0,5$) sur boîte de pétrie. Après incubation de 5 à 7 jours à 28°C, l'apparition d'un halo autour de la colonie avec un virage de la couleur verte du milieu vers une couleur bleu, indique une fixation d'azote positive.

La comparaison de la capacité fixatrice entre les bactéries testées, est déterminée par le calcul du diamètre du virage obtenu pour chacune d'elles. La zone colorée est calculée en soustrayant le diamètre de la colonie dans chaque cas (Dobereiner et Day, 1976). Pour chacune des bactéries, une répétition de trois est réalisée.

III.2. Solubilisation des phosphates

Les bactéries nodulaires sont testées pour leur capacité de solubiliser les phosphates qualitativement sur milieu solide et quantitativement sur milieu liquide.

III.2.1. Solubilisation des phosphates sur milieu solide (test qualitatif)

Afin de détecter toute activité bactérienne solubilitrice du phosphate, et à cause de la grande diversité des bactéries à tester, le test de solubilisation est réalisé sur trois milieux différents contenant le phosphate tricalcique $[Ca_3(PO_4)]$ comme phosphate complexe. Le principe de conclure sur la capacité solubilitrice du phosphate est le même quel que soit le milieu utilisé. Après incubation, l'apparition d'un halo autour de la colonie permet de dire que la bactérie est capable de solubiliser le phosphate complexe.

L'indice de solubilisation (IS) est calculé par la formule suivante selon (Nguyen *et al*, 1992):

$$IS(\%) = \frac{\text{Diamètre de l'halo (mm)} - \text{diamètre de la colonie (mm)}}{\text{Diamètre de la colonie (mm)}} \times 100$$

Pour chaque bactérie, une répétition de trois est réalisée quel que soit le milieu utilisé.

a. Sur milieu PVK (Pikovskaya)

Les souches bactériennes sont déposées par touche sur le milieu Pikovskaya (PVK) solide (Annexe I), contenant 0,5% de phosphate tricalcique [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$] comme source de phosphate insoluble (Pikovskaya, 1948), à raison de 4 souches par boîte. Un volume de 25 μl de chacune des suspensions bactériennes issues de pré-cultures fraîches ($\text{Do} > 0,5$), est déposé à la surface du milieu (Pikovskaya, 1948). L'incubation est réalisée à 28 ± 2 °C pendant 7 jours.

b. Sur milieu NBRIP (National Botanical Research Institut'Phosphate)

Les bactéries sont ensemencées par striation sur milieu National Botanical Research Institut's Phosphate (NBRIP) solide (Annexe I), le milieu contient 0,5% de phosphate tricalcique [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$] comme source de phosphate insoluble (Nautiyal, 1999). L'incubation est réalisée à 28 ± 2 °C pendant 7 jours.

c. Sur milieu YED (Yeast Extract Dextrose)

Le milieu Yeast Extract Dextrose (YED) contient également comme source de phosphate insoluble 0,5 % de phosphate tricalcique [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$], sur lequel les bactéries sont ensemencées aussi par striation, puis incubé à 28 °C pendant 5 à 7 jours.

III.2.2. Solubilisation des phosphates en milieu liquide (test quantitatif)

Les bactéries sélectionnés à la suite du premier test, et qui ont présenté un indice de solubilisation élevé sur les trois types de milieux de culture (PVK, NBRIP, YED), sont soumises au test quantitatif sur milieu liquide. Dans ce cas nous avons utilisé selon (Nautiyaul, 1999), le milieu NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium) qui contient 0,5% de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$. Ainsi, des flacons de 250ml sont rempli de 100 ml du milieu NBRIP, et chaque flacon est inoculé par 2ml d'une culture bactérienne fraîche, dont la densité est proche de 0,8 (La densité optique initiale du milieu inoculé doit avoir une valeur d'ordre 0,05 lors d'ensemencement), le tout est incubé à 28 ± 2 °C pendant 8 jours, sous agitation modérée 180tr/mn (Cherif, 2014).

Des prélèvements sont effectués au temps t_0 , puis après 24h, 48h, 36,jusqu'à 8 jours pour déterminer trois paramètres:

- ② Une lecture de la DO à 600 nm
- ② Une lecture de pH.
- ② La mesure du P libre

Pour chacune des souches, trois flacons sont utilisées.

III.2.2.1. Lecture de la DO à 600 nm et détermination du pH

La croissance bactérienne et l'acidité du milieu, sont déterminées par un prélèvement de 10ml obtenu chaque jour. Pour chaque aliquote le pH ainsi que la DO à 600nm sont mesurés. Pour chacune des souches, trois répétitions sont utilisées.

III.2.2.2. La mesure du P libre

a. Préparation d'un courbe étalon de KH_2PO_4

Une gamme étalon est préparée avec des solutions dont le contenu en phosphate libre est connu, la source de phosphate utilisé étant le KH_2PO_4 préparée à des concentrations progressives de phosphates libres dans de l'eau distillé (Jackson, 1973). Des concentrations allant de 0,1 jusqu'à 0,4 g/ml sont utilisées. Le dosage du phosphate soluble est réalisé par colorimétrie à 890nm (Harwood *et al.*, 1969).

b. Détermination des concentrations en phosphate libérées par les cultures

Le dosage du phosphate n'a touché que les bactéries ayant montré un $\text{IS} > 2$ (Choi *et al.*, 2006). Pour chacun des bactéries, 50 ml du milieu NBRIP liquide est inoculé par 200 μl de l'inoculum, le tout est incubé à 28 ± 2 °C pendant 7jours sous agitation modéré de 180 rpm (Rfaki *et al.*, 2015). Chaque jour, un aliquote de 2ml est centrifugé a 10000rpm pendant 10 min (Dipak *et al.*, 2016). Le surnageant est utilisé pour quantifier le phosphate solubilisé par colorimétrie à 890nm (Harwood *et al.*, 1969). L'eau distillée a servi comme témoin négatif.

La quantité du phosphate soluble est calculée à partir de la courbe d'étalonnage standard et les valeurs du phosphate soluble libéré sont exprimées en g/ml, (Cherif, 2014).

IV. Mise en évidence de l'activité antagoniste des bactéries nodulaires vis-à-vis des microorganismes pathogènes du pois chiche

IV.1. Activité antibactérienne

La technique utilisée est celle des disques. Les boîtes remplies de milieu gélosé Mueller-Hinton-agar, sontensemencées (à l'aide d'un râteau) en surface par la suspension de la souche pathogène en phase exponentielle ($Do > 0,5$). D'autre part, les disques vierges (BioMérieux), de 5 mm de diamètres sont remplis par 60 μ l d'une suspension bactérienne nodulaire dont la Do est supérieur à 0,5. Après leur séchage, les disques sont déposés sur le milieu de cultureensemencés avec une bactérie pathogène. Après une incubation des boîtes à 30°C pendant 24h, l'activité antibactérienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques (Choi *et al*, 2006). Les bactéries antagonistes sont comparées en leur capacité inhibitrice du pathogène par la mesure des diamètres des zones d'inhibition qui apparaissent. Le résultat est positif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur de 2mm (Choi *et al*, 2006).

La mesure du diamètre d'inhibition Z_i est effectuée selon la formule suivante :

$$Z_i \text{ (mm)} = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm)} - \text{diamètre du disque (5 mm)}$$

IV.2. Activité antifongique

L'activité antagoniste des bactéries contre les champignons pathogènes est réalisée par une confrontation directe *in vitro* sur boîtes gélosées. Une quantité de 10 μ l d'un inoculum en phase exponentielle ($Do > 0,5$) est inoculée sous forme d'une strie rectiligne partageant la boîte en deux parties égales. De part et d'autre du strie et à 1 cm du bord de la boîte, deux disques, de 5 mm de diamètre, obtenus par l'emporte-pièce, d'une culture de champignon sur gélose au PDA a pH 7, sont déposés. Les boîtes témoins ne sont pasensemencées avec la bactérie et ne contiennent que les disques de champignons. Les repiquages sont effectués en même temps (Benhamou, Chet, 1996). L'incubation est réalisée à 25 °C pendant 7 jours. Le suivi de l'inhibition de la croissance diamétrale des colonies des champignons sont

effectuées tous les deux jours, jusqu'à ce que le champignon de la boîte témoin recouvre le milieu de culture.

L'évaluation de l'inhibition exercée par la bactérie antagoniste est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule suivante (Hmouni *et al.*, 1996) :

$$I (\%) = (1 - C_n/C_o) \times 100$$

C_n : est le diamètre moyen des colonies en présence de l'antagoniste.

C_o : est le diamètre moyen des colonies témoins.

Résultats et discussion

I. Caractères phénotypiques des bactéries utilisées

I.1. Les bactéries nodulaires

Les bactéries examinées dans ce travail donnent sur milieu solide au bout de 3 à 7 Jours des colonies homogènes, circulaires avec un aspect visqueux et une opacité translucide. Certaines d'entre elles absorbent faiblement le rouge de Congo et d'autres ne le absorbent pas et gardent leur couleur blanchâtre (Figure 3). Plusieurs critères sont suivis pour détecter et décrire l'aspect phénotypique des bactéries (Tableau 3).

Tableau 3 : Propriétés des colonies de différentes souches bactériennes

Souches	Couleur	Forme	Elévation	Aspect
1	Rose claire	Circulaire	Plate	Visqueux
2	Rose claire	Circulaire	Plate	Visqueux
3	Blanche	Circulaire	Bombée	Visqueux
4	Rose foncée	Circulaire	Bombée	Visqueux
5	Rose claire	Circulaire	Bombée	Visqueux
6	Rose claire	Circulaire	Plate	Visqueux
7	Rose claire	Circulaire	Plate	Visqueux
8	Blanche	Circulaire	Convexe	Visqueux
9	Rose foncée	Circulaire	Bombée	Visqueux
10	Rose foncée	Circulaire	Bombée	Visqueux
11	Blanche	Circulaire	Convexe	Visqueux
12	Blanche	Circulaire	Bombée	Visqueux
13	Rose claire	Circulaire	Convexe	Visqueux
14	Blanche	Circulaire	Plate	Visqueux
15	Blanche	Circulaire	Plate	Visqueux
16	Rose claire	Circulaire	Bombée	Visqueux

Sur milieu liquide, l'obtention du trouble commence après trois jours pour la majorité des bactéries nodulaires utilisées.

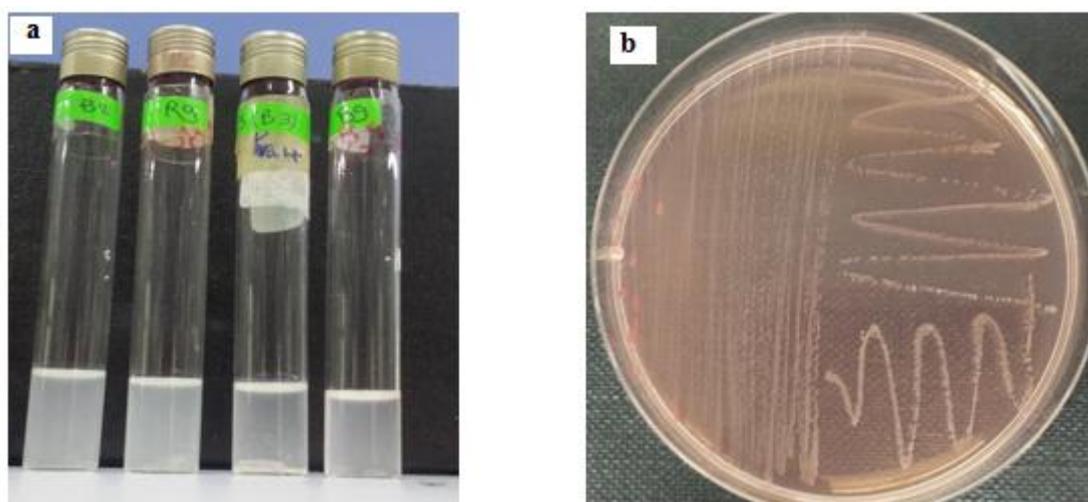


Figure 3: Croissance des bactéries nodulaires, (a) sur milieu liquide (YMB), (b) sur milieu solide (YMA).

I.2. Les bactéries non nodulaires

L'ensemencement en stries sur milieu solide des bactéries pathogènes sur GN a permis d'obtenir de petites colonies rondes blanchâtres après incubation à 30°C/24h. Une croissance de toutes les bactéries non nodulaires sur le milieu liquide (BN) a été remarquée dans 18h (Tableau 4).

Tableau 4 : Caractéristiques des bactéries pathogènes

Bactéries pathogènes	Couleur	Forme	Elévation	Aspect
<i>Staphilococcus</i>	Blanche	Circulaire	Bombée	Sec
<i>E.coli</i>	Blanche	Circulaire	Bombée	Sec
<i>Citrobacter</i>	Blanche	Circulaire	Bombée	Visqueux
<i>Morganella</i>	Blanche	Circulaire	Plate	Sec
<i>Pseudomonas</i>	Blanche	Circulaire	Bombée	Visqueuse
<i>Proteus</i>	Blanche	Circulaire	Bombée	Sec
P 3(<i>Pseudomonas japonica</i>)	Blanche	Circulaire	Plate	Visqueux
P 12 (<i>Bcillus amyloolithique faciens</i>)	Blanche	Circulaire	Plate	Visqueux
P 14(<i>Pantoea.sp</i>)	Blanche	Circulaire	plate	Visqueux

I.3. Les champignons phytopathogènes

Après une incubation de 7 jours, une croissance sur la totalité de la boîte a été remarquée pour les deux souches fongiques utilisées, un mycélium de couleur blanche avec des hyphes denses cotonneux (figure 4).

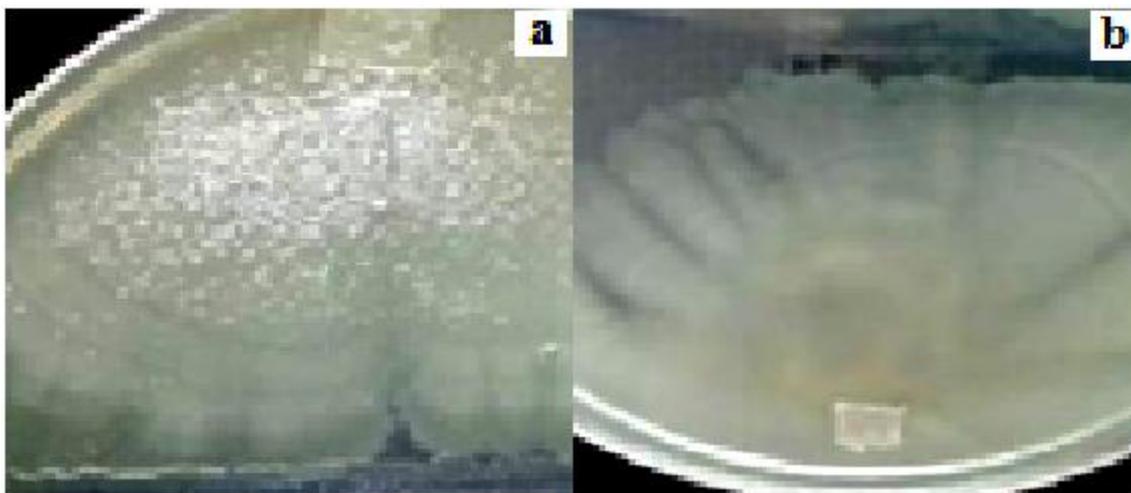


Figure 4: Caractères phénotypiques des champignons, (a) : *Fusarium redolens* ,
(b) : *Alternaria graminicola*

II. Mise en évidence des activités biologiques des bactéries nodulaires

II.1. Transformation de l'azote

II.1.1. Test sur milieu liquide

Après 4 jours d'incubation, l'addition de 3 à 4 gouttes de réactifs nitrate réductase I et II n'a pas changé le milieu (absence de coloration rouge) chez tous les souches (Figure 5), après l'addition de la poudre de zinc, les bactéries ont toutes donné une réaction négative (Tableau 5), le milieu est toujours inchangée, la couleur reste presque jaunâtre ce qui indique un résultat positive, sauf pour le cas de la souche 12 qui a montré un virage de couleur du milieu vers le rose clair ce qui indique qu'elle ne possède pas la nitrate réductase et donc qu'elle est incapable de réduire le nitrate. Ainsi on peut dire qu'excepté la souche 12 les bactéries nodulaires possèdent une activité nitrate réductase.

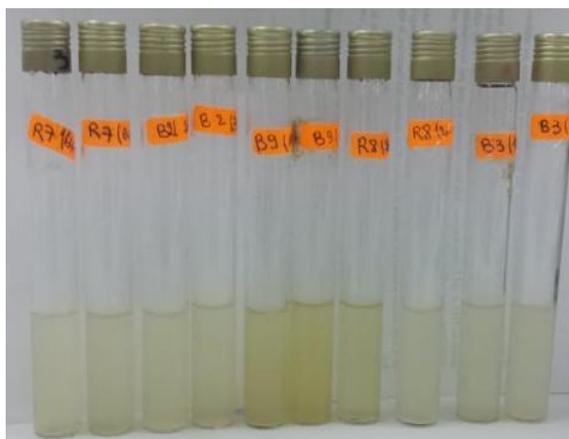


Figure 5: Résultat du test de nitrate réductase sur le milieu TY

Tableau 5 : Test de l'activité nitrate réductase

Souche	Résultat après l'ajout des réactifs N I et N II	Après l'ajout de poudre de zinc
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	+
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-

- : le milieu ne change pas de couleur (aucune teinte obtenu)

+ : Le milieu change de couleur, une teinte rose claire obtenu

II.1.2. Test sur milieu solide NFMM

Sur le milieu NFMM, et après incubation, des halos clairs sont apparus autour des colonies pour la majorité des bactéries nodulaires (les souches 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 15), ce qui prouve encore une fois leur capacité de fixer l'azote atmosphérique. Pour les autres bactéries (1, 8, 9, 11 et 16), aucun halo n'est apparu (Tableau 6, Figure 6, Figure 7).

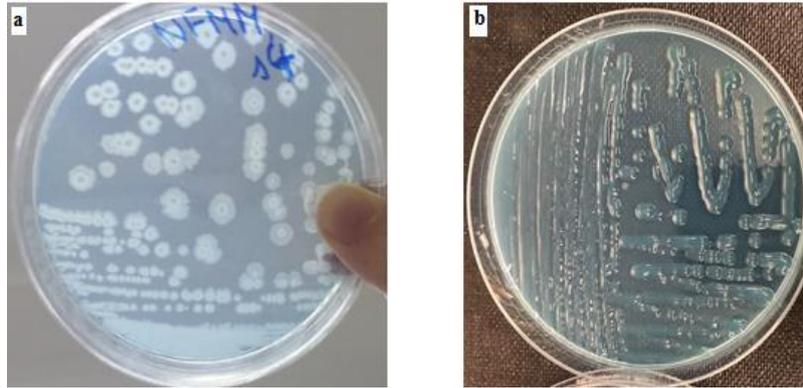


Figure 6 : Résultats du test de la nitrogénase (a) : résultat positif, (b) : résultat négatif

Tableau 6 : Diamètres des colonies, des halos et des zones colorées des souches nodulaires

Souche	Résultats	Diamètre de la colonie (mm)	Diamètre d'halo (mm)	Diamètre de la zone colorée (mm)
1	-	2 ± 1	-	-
2	+	1 ± 0	3 ± 0	2
3	+	1 ± 0	4 ± 1	3
4	+++	2 ± 1	9 ± 0	7
5	++	1 ± 0	6 ± 2	5
6	++	2 ± 1	4 ± 0	2
7	+	2 ± 0	5 ± 1	3
8	-	2 ± 1	-	-
9	-	1 ± 0	-	-
10	++	1 ± 0	5 ± 0	4
11	-	2 ± 1	-	-
12	+	1 ± 0	4 ± 1	3
13	+	3 ± 2	4 ± 0	1
14	+++	3 ± 1	8 ± 1	5
15	+	1 ± 0	4 ± 2	3
16	-	2 ± 1	-	-

- :

Résultat négatif / Halo indétectable à cause de la concentration élevée des exo-polysaccharides.

+ : Résultat positif / Détection d'un halo.

La zone colorée = Le diamètre du virage obtenu – Le diamètre de la colonie

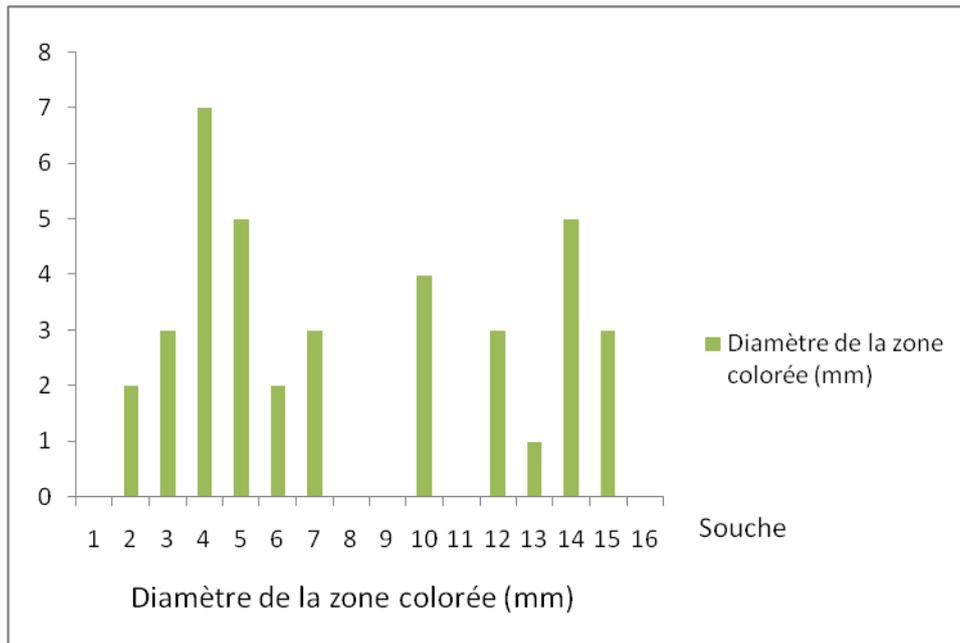


Figure 7 : Diamètre de la zone colorée en fonction de la souche bactérienne.

Ce qui est remarquable aussi c'est que même si le halo est présent ou non, un virage de la couleur du milieu est obtenu juste après 24h pour certaines souches (3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16), alors que pour le reste des souches le temps de virage de couleur a pris plus de temps.

II.2. Solubilisation des phosphates

II.2.1. Solubilisation des phosphates sur milieu solide

Les souches sont cultivés sur les trois milieux solide (PVK, NBRIP, YED) (Annexe I) avec comme seul source de [phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$]. La mise en évidence de la capacité de solubiliser le phosphate naturel est déterminée par l'apparition des halos clairs autour des colonies (Tableau 7). Ces derniers sont apparus (au moins sur un des trois milieux utilisés) chez sept bactéries nodulaires (1, 2, 3, 4, 6, 7 et 15) (Figure 8).



Figure 8: Apparition des halos sur trois milieux différents (a) : PVK, (b) : YED, (c) : NBRIP.

Tableau 7 : Présence ou absence d'halos selon le milieu de culture

Les souches	PVK	YED	NBRIP
1	++	++	++
2	++	-	+
3	++	+	-
4	++	-	++
5	-	-	-
6	++	-	-
7	++	+	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14			
15	++	++	++
16	-	-	-

- : Absence d'halo

+ : présence d'un halo faible

++ : présence d'un halo très clair

Afin de comparer leurs capacités à solubiliser le phosphate naturel, les diamètres des colonies ainsi que ceux des halos clairs autour des colonies sont mesurés, pour les sept bactéries qui ont donné un résultat positif (Tableau 8).

Tableau 8 : Diamètres des colonies et des halos sur trois milieux de culture

Milieu de culture	Souche	1	2	3	4	6	7	15
PVK	Diamètres des colonies (mm)	11 ± 0	8 ± 1	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 2	7 ± 0	12 ± 0
	Diamètres des halos (mm)	14 ± 4	13 ± 4	8 ± 2	9 ± 0	13 ± 3	11 ± 0	16 ± 1
YED	Diamètres des colonies (mm)	2 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	-	1 ± 0	1 ± 0
	Diamètres des halos (mm)	7 ± 1	-	2,5 ± 0,5	-	-	5 ± 2	2 ± 1
NBRIP	Diamètres des colonies (mm)	1 ± 0	2 ± 0	-	3 ± 0	-	-	1 ± 0
	Diamètres des halos (mm)	3 ± 0	6 ± 1	-	8,5 ± 0,5	-	-	6,5 ± 0,5

A partir de ces données, l'indice de solubilisation (IS) en % est calculé (Figure 9). La bactérie qui présente le plus grand indice de solubilisation est la bactérie qui a le plus important pouvoir de solubiliser le phosphate naturel. En les comparants par cet indice, selon le milieu de culture il est remarquable que sur le milieu PVK, la souche 6 a donné le meilleur IS, suivie par la souche S2 puis S7, la souche S1 a donné le plus bas indice. Sur milieu YED la souche S7 a donné le meilleur résultat, suivie par S1 et S3, la souche S15 vient en dernière

position. Contrairement au cas précédent, sur le milieu NBRIP, c'est la souche S15 qui a montré le meilleur indice de solubilisation suivie par la souche S4, tandis que les deux souches S1 et S2 se sont comportées de la même manière en donnant le même indice de solubilisation.

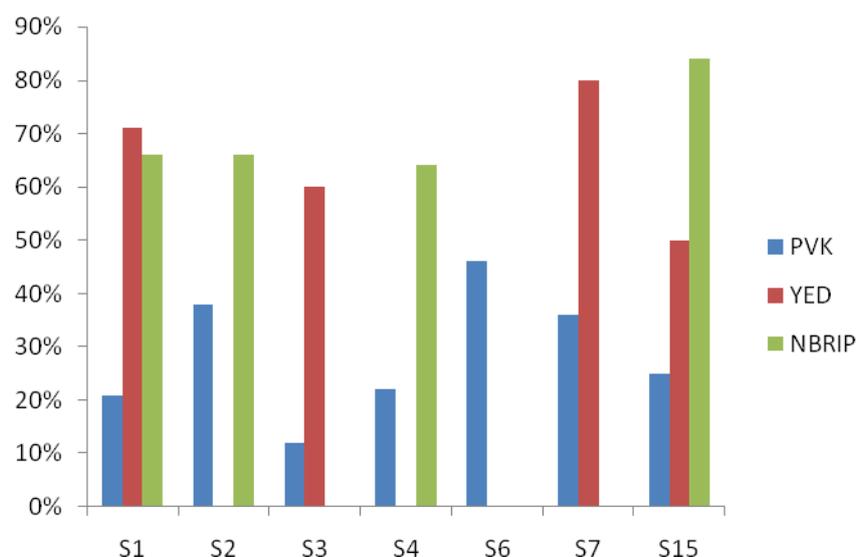


Figure 9 : Diagramme en bâtonnet représentant l'indice de solubilisation (IS) en % des souches solubitrices du phosphate naturel, sur trois milieux de culture solide, (Si : souche, i= 1, 2, 3, 4, 6, 7, 15)

Ainsi, l'indice de solubilisation de chacune des bactéries testée est dépendant du milieu de culture. Par exemple l'indice de solubilisation de la souche S15 est plus important sur le milieu PVK alors que celui de la souche S7 est plus important sur le milieu YED. A cause de toute ces variabilité dans le pouvoir de solubilisation, la sélection des souches pour le test de quantification de phosphate s'est porté sur deux points essentiels. Le premier est de sélectionner la souche qui montre une capacité de solubilisation sur les trois milieux et le deuxième point consiste à sélectionner celle qui montre un meilleur indice de solubilisation. Suite à ces données, trois souches (1,4 et 15), sont sélectionnées pour le test suivant.

II.2.2.Solubilisation des phosphates sur milieu liquide

Les mesures de pH et de la DO ainsi que la quantité de phosphate libre, sont enregistrés depuis l'inoculation du milieu de culture (t=0), jusqu'au huitième jour d'incubation (t8), pour chacune des souches solubilitrices du phosphate naturel (Tableau 9).

Tableau 9 : Croissance, pH et quantité de phosphate libre montrés par les souches solubitrices du phosphate sur milieu liquide

jour	Souche	Do Croissance	PH	Do P libre
1	1	1,32 ± 0,14	6,7 ± 0,13	0,26 ± 0,09
	4	1,03 ± 0,17	6,6 ± 0,33	0,16 ± 0,04
	15	1,58 ± 0,20	6,8 ± 0,15	0,16 ± 0,04
2	1	1,19 ± 0,22	6,9 ± 0,13	0,32 ± 0,10
	4	1,34 ± 0,13	6,9 ± 0,20	0,24 ± 0,04
	15	1,39 ± 0,18	6,8 ± 0,29	0,34 ± 0,07
3	1	1,00 ± 0,12	4,2 ± 0,11	0,23 ± 0,06
	4	0,53 ± 0,31	4,3 ± 0,22	0,16 ± 0,08
	15	1,74 ± 0,12	6,2 ± 0,15	0,18 ± 0,02
4	1	0,90 ± 0,17	4,9 ± 0,07	0,27 ± 0,02
	4	0,40 ± 0,25	5,0 ± 0,11	0,11 ± 0,01
	15	1,86 ± 0,09	6,1 ± 0,91	0,24 ± 0,07
5	1	0,98 ± 0,17	5,5 ± 0,75	0,16 ± 0,04
	4	0,66 ± 0,02	6,7 ± 0,73	0,17 ± 0,05
	15	0,90 ± 0,21	6,0 ± 0,67	0,17 ± 0,02
6	1	1,12 ± 0,10	6,3 ± 0,47	0,22 ± 0,07
	4	1,13 ± 0,10	6,3 ± 0,84	0,16 ± 0,03
	15	1,49 ± 0,09	6,3 ± 0,27	0,21 ± 0,05
7	1	1,08 ± 0,10	6,2 ± 0,35	0,16 ± 0,07
	4	1,08 ± 0,01	4,7 ± 0,80	0,16 ± 0,03
	15	1,64 ± 0,11	3,2 ± 0,15	0,12 ± 0,02
8	1	1,03 ± 0,04	5,3 ± 0,60	0,16 ± 0,05
	4	0,93 ± 0,16	4,4 ± 0,15	0,18 ± 0,04
	15	1,24 ± 0,24	4,3 ± 0,04	0,22 ± 0,06
9	1	1,01 ± 0,19	6,0 ± 0,55	0,17 ± 0,03
	4	0,98 ± 0,20	5,2 ± 0,11	0,20 ± 0,11
	15	0,93 ± 0,27	5,1 ± 0,04	0,28 ± 0,08

II.2.2.1. Mesure du pH et de la croissance

Au cours d'une incubation de neuf jours, des bactéries testées pour la solubilisation, le pH et la DO sont mesurés chaque jour, (Figure 10).

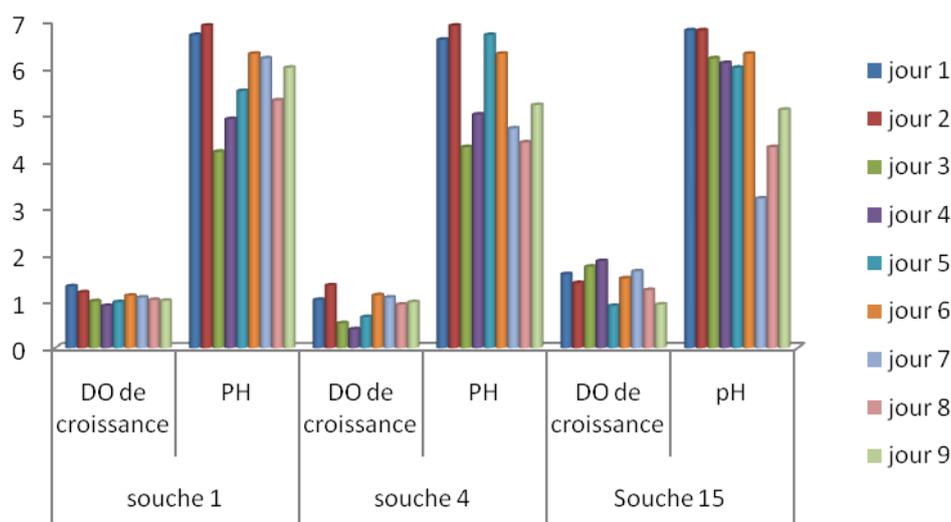


Figure 10 : Croissance et pH des souches solubilitrices en fonction du temps.

En présence du phosphate naturel, la croissance est variable selon la souche et selon le temps. La meilleure croissance est celle remarquée pour la souche 15 par rapport aux deux autres pour la majorité des jours. La souche 15 marque sa croissance maximale dans le quatrième jour d'incubation. La souche 4 montre sa meilleure croissance pendant le deuxième jour d'incubation alors que la souche 1 est dans son maximum de croissance dans le premier jour.

Contrairement au cas de la souche 15, le pH, est augmenté légèrement pendant le deuxième jour d'incubation pour les souches 1 et 4. Le milieu est devenu acide pour ces deux souches au cours du troisième jour d'incubation. La souche 4 a montré le même niveau d'acidité pendant le huitième jour alors que la plus grande acidité pour la souche 15 est enregistrée pendant le septième jour d'incubation.

En comparant la croissance et l'acidité du milieu, nous remarquons que pour chacune des trois souches, le pH est stable à sa neutralité dans le jour où la souche montre sa meilleure croissance. Le pH devient acide dans la phase où la croissance est réduite pour les souches 1 et 4, le cas est contraire pour la souche 15 qui dans le cinquième jour montre une croissance plus faible mais un pH encore proche du neutre.

II.2.2.2. Mesure du P libre

Les absorbances des solutions contenant du K_2HPO_4 à différentes concentrations en g/ml d'eau distillé (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 g/ml), nous ont permis de dresser une courbe d'étalonnage avec une équation de type $Y= Ax+B$ (Figure 11).

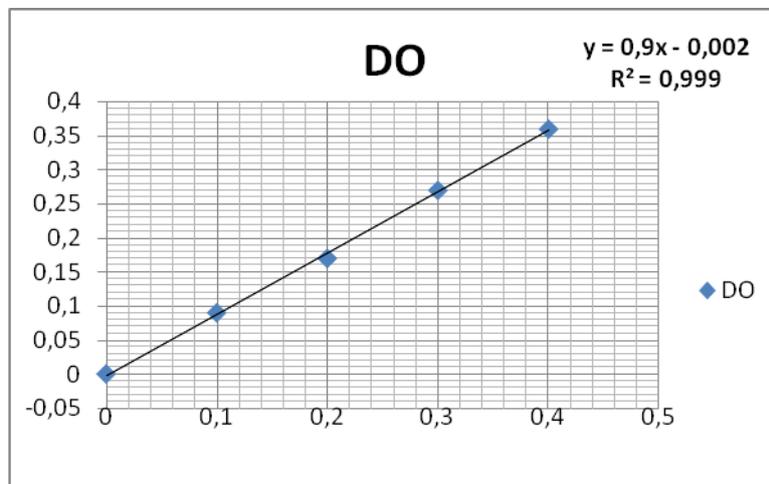


Figure11 : Courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction de la concentration du phosphate libre (K_2HPO_4)

L'équation obtenue ($Y=0,9x-0,002$, avec $R^2=0,999$), nous a permis de calculer la quantité de phosphate libre libérée ou donnée par chacune des trois bactéries solubilitrices suivies dans ce test. Les valeurs de l'absorbance du phosphate libre enregistrées pour chaque jour pendant une période de 9 jours ont servi aussi dans le calcul (Tableau 10).

Tableau 10 : Densité optique du phosphate libre obtenu pendant 9 jours d'incubation des souches nodulaires

Jour	souche 1	souche 4	souche15
1	0,26 ± 0,09	0,16 ± 0,04	0,16 ± 0,04
2	0,32 ± 0,10	0,24 ± 0,04	0,34 ± 0,07
3	0,23 ± 0,06	0,16 ± 0,08	0,18 ± 0,02
4	0,27 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,24 ± 0,07
5	0,16 ± 0,04	0,17 ± 0,05	0,17 ± 0,02
6	0,22 ± 0,07	0,16 ± 0,03	0,21 ± 0,05
7	0,16 ± 0,07	0,16 ± 0,03	0,12 ± 0,02
8	0,16 ± 0,05	0,18 ± 0,04	0,22 ± 0,06
9	0,17 ± 0,03	0,20 ± 0,11	0,28 ± 0,08

Ainsi pendant 9 jours et pour chaque jour d'incubation, la quantité de phosphate naturel (en mg/l) que chacune des souches testées a pu solubiliser en phosphate libre (Figure 12) est enregistrée.

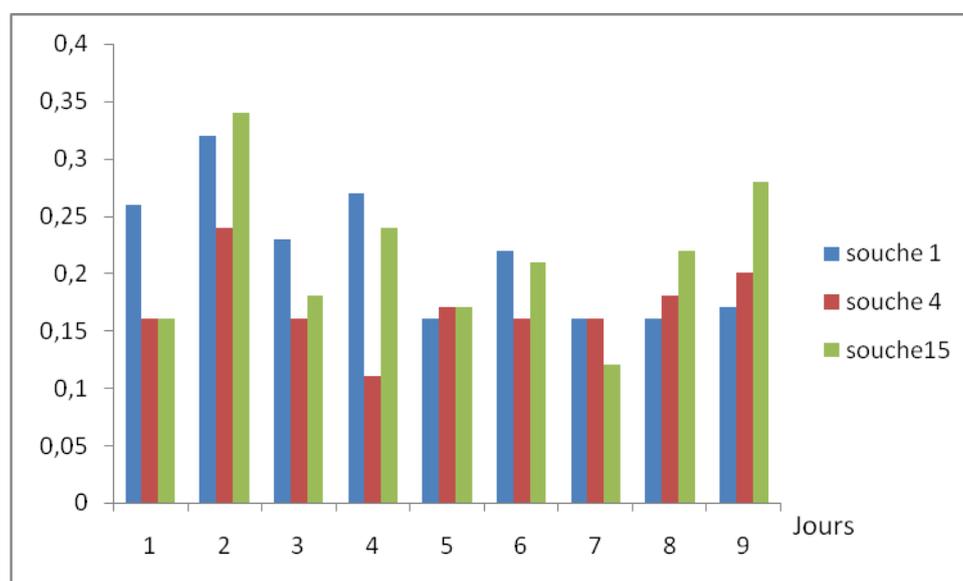


Figure 12 : Diagramme en bâtonnet représentant la quantité en phosphore libre (mg/l), libérée par souche bactérienne et par jour

En comparant entre les jours d'incubation en quantité de phosphate solubilisé par les trois souches, nous remarquons que la plus grande quantité pour les trois souches est celle

solubilisée au cours de leur deuxième jour d'incubation. Dans le premier jour c'est la souche 1 qui a montré la plus grande quantité en phosphate libre, contrairement aux deux autres qui ont donné la même quantité inférieure à celle de la souche 1. Dans le troisième jour, la meilleure quantité est donnée par la même souche. Dans le quatrième jour c'est toujours la souche 1 qui est remarquable avec la souche 15. Dans le cinquième jour, les trois souches libèrent des quantités en phosphates libres très proches. Dans le sixième jour, le résultat pour les trois souches est similaire à celui obtenu le quatrième jour. Le résultat du septième jour est similaire à celui du cinquième jour. Dans le huitième jour, la quantité en phosphate solubilisé est plus importante chez la souche 15 et enfin dans le neuvième jour, cette dernière souche est clairement la meilleur solubilitrice du phosphate.

Donc si on compare tous les données ensemble on peut dire que la meilleure quantité de phosphate solubilisé peut être obtenue après deux jours d'incubation de souches nodulaires, avec une importance plus enregistrée par la souche 15 qui a pu solubiliser plus de phosphate libre que les deux autres dans cette période. L'importance de cette souche aussi est bien remarquable dans le dernier jour d'incubation, où la souche a pu libérer une quantité en phosphate libre beaucoup plus importante que celles donnée par les deux autres souches bactériennes.

III. Mise en évidence de l'antagonisme des bactéries nodulaires vis-à-vis des microorganismes pathogènes du pois chiche

III.1. Activité antibactérienne

Parmi les 16 souches testées, seulement 11 (1, 2, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 14, 15 et 16), montrent une zone d'inhibition autour des disques (Figure 13), en présence de la bactérie pathogène indicatrice. D'autres parts parmi 9 bactéries pathogènes, seulement cinq (*Staphylococcus*, p14, p3, p12, p14), ont trouvé une activité inhibitrice contre leur croissance, donnée par les bactéries nodulaires (Tableau 11, Figure 14).



Figure 13: Zones d'inhibition des bactéries nodulaires contre la bactérie pathogène

Tableau 11 : Diamètre des zones d'inhibition obtenues autour des colonies des bactéries nodulaires

Souche nodulaire	<i>Staphylococcus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Citrobater</i>	<i>Morganella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Proteus</i>	<i>p3</i>	<i>p12</i>	<i>p14</i>
1	7	-	-	-	-	-	-	14	14
2	9	-	-	-	-	-	-	16	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	8	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	8	-	-	-	-	-	8	-	-
7	6	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	17	-	-
10	10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	17	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	14	-	11	-	-	-	-	-	-
15	-	-	8	-	-	-	10	-	9
16	-	-	15	-	-	-	13	-	-

- : Résultat négatif (Absencede zone d'inhibition).

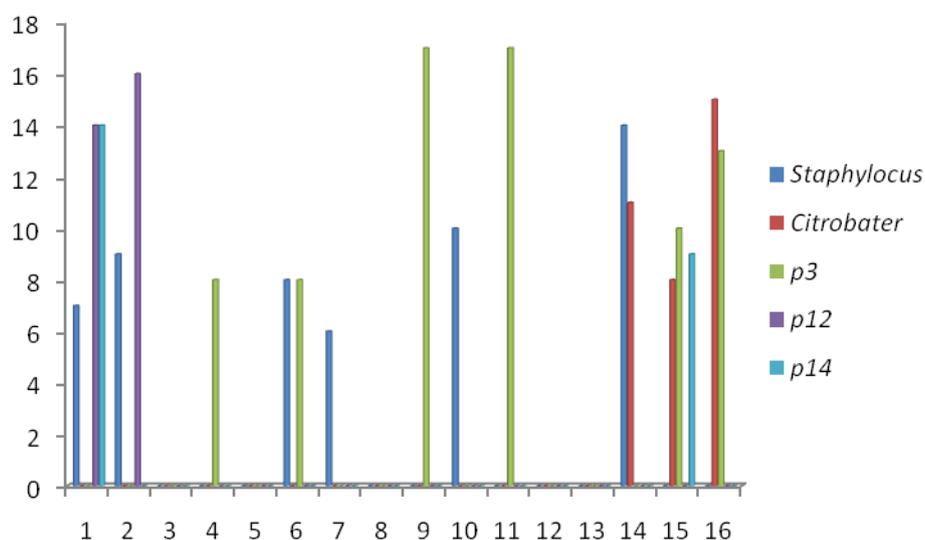


Figure 14 : Diamètre d’inhibitions données par les souches nodulaires en présence de cinq bactéries pathogènes

La plus grande activité antibactérienne des souches nodulaires est donnée par les deux bactéries 9 et 11 (*Pantae agglomerans* et *Burkholderiaceae bacterium*) contre la souche pathogène P3 (*Pseudomonas japonica*). Cette dernière est suivie par celle de la souche 2 (*Burkholderiaceae bacterium*) contre la bactérie phyto pathogène p12 (*Bcillus amyloplitique faciens*). L’activité de la souche 16 (*Ensife rneliloti 2011*) contre *Citrobacter* prend la troisième position. La plus faible activité antibatérienne est montré par la souche 7 (*Burkholderia terricola*) contre la souche phytopathogène P14 (*Pantoea sp.*). La souche *Staphylococcus*, se trouve inhibée fortement par la souche 14 (*Burkholderiaceae bacterium*) puis la souche 10 (*Sodalis paraecaptivus*).

III.2. Activité antifongique

Parmi les 16 souches testées, quinze souches montrent une inhibition de la croissance mycélienne (Figure 15), (une inhibition apparue au moins chez l'une des deux champignons), et seulement une seule souche (souche 6) apparaît non capable (Tableau 12, Figure 16).

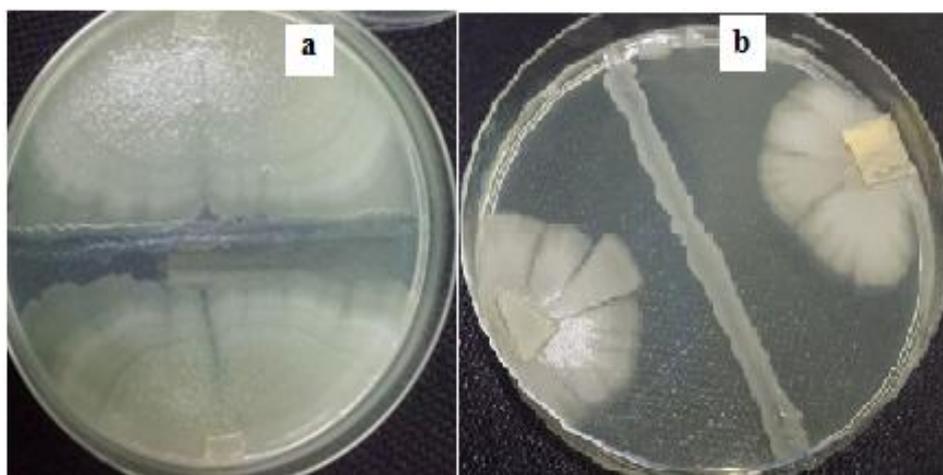


Figure 15: Croissance du champignon F9 en absence (a) et en présence d'une bactérie nodulaire.

Tableau 12 : Pourcentage d'inhibition bactérienne, diamètre de croissance mycélienne

Souche	Champignon F9				Champignon F 11			
	Résultat	diamètre de disque (mm)	diamètre de croissance (mm)	I%	Résultat	diamètre de disque (mm)	diamètre de croissance (mm)	I%
Témoin		7,5±0,5	30,5±3,5	4,35		4,5±0,5	34,5±1,5	3,33
1	+	8±2	20±2	8,33	+	5±0	26,5±0,5	4,65
2	+	8,5±0,5	22,5±0,5	7,14	+	4,5±0,5	25±2	4,88
3	-	9,5±0,5	36±1	3,77	+	4±0	32±3	3,57
4	-	9,5 ±0,5	37,5±0,5	3,57	+	4±0	30,5±1,5	3,77
5	+	8±1	30±0	4,55	+	4±0	29,5±0,5	3,92
6	-	8,5±0,5	36±6	3,64	-	4,5±0,5	34,5±1,5	3,33
7	+	7,5 ±0,5	24,5±3,5	5,88	+	5±0	25±1	5,00
8	-	6,5 ±0,5	38,5±0,5	3,13	+	4,5±0,5	26,5±1,5	4,55
9	+	6±0	22±1	6,25	+	4±0	30±1	3,85
10	-	8,5±0,5	31±0	4,44	+	4±0	26±2	4,55
11	+	8,5±0,5	26±1	5,71	+	5±0	31,5±2,5	3,77
12	-	9±0	39,5±6,5	3,28	+	4±1	32,5±2,5	3,51
13	+	9,5±0,5	25±3	6,45	+	4,5±0,5	30±2	3,92
14	+	7±0	22±0	6,67	+	5±0	26,5±0,5	4,65
15	+	9,5±0,5	27,5±1,5	5,56	+	4,5±0,5	27±1	4,44
16	+	8,5±0,5	24,5±0,5	6,25	+	4±0	29±2	4,00

Pour chaque cas, le résultat est considéré négatif si le pourcentage d'inhibition (I%), calculé est trouvé inférieur à celui du témoin.

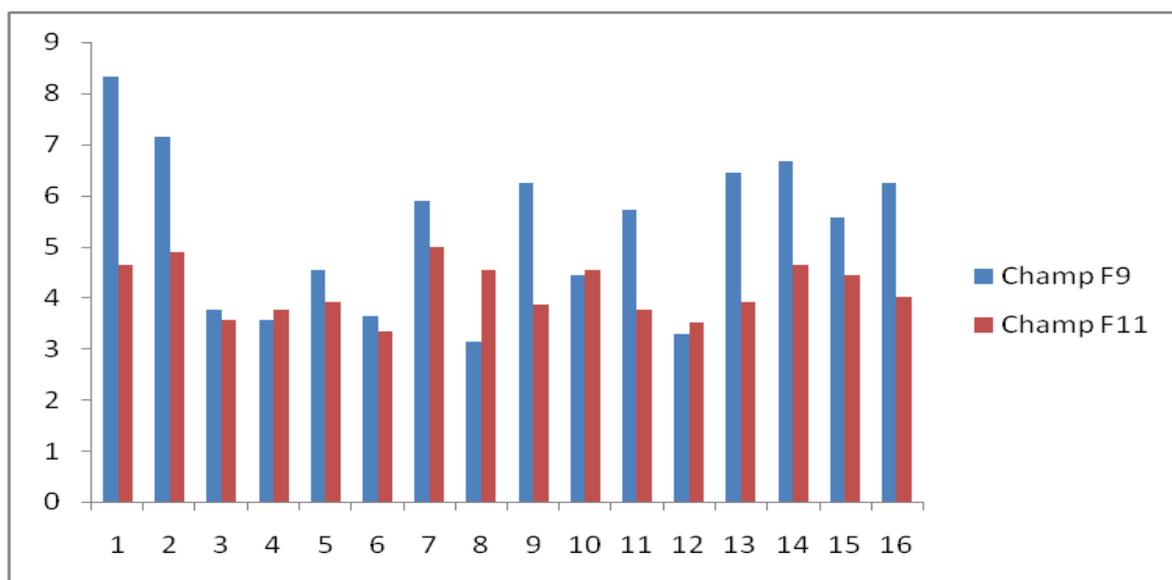


Figure 16 : Pourcentage d’inhibitions des champignons pathogènes par les souches nodulaires

La plus grande activité antifongique des souches nodulaires est donnée par la bactérie 1 contre le champignon F9, suivie respectivement par les souches 2, 14, 13, 9, 16, 7, 11, 15, 5; les bactéries 3, 4, 6, 8, 10, 12 ne possèdent pas la capacité inhibitrice de ce champignon. Concernant l’inhibition du champignon F11, la bactérie 7 est la plus puissante, suivie par les souches 2, 1, 14, 10, 8, 15, 16, 5, 9, 13, 11, 4, 3, 12. Il est clairement remarqué que la souche 6 montre une faible inhibition ce qui reflète faible activité antifongique contre ce champignon.

Les deux bactéries 1 et 2 possèdent une bonne capacité inhibitrice contre les deux champignons à la fois, elles ont donc la meilleure activité antifongique.

Discussion Générale

1. Les caractères phénotypiques des bactéries utilisés sont stables

Quel que soit leur type nodulaire ou non nodulaire, après repiquage une certaine stabilité de des caractères phénotypique est remarquée pour les bactéries utilisées dans cette étude. Pour le cas des bactéries nodulaires, tous les caractères montrés sont semblables à ceux des rhizobias, notamment par rapport à leur aspect visqueux lié à la production des polysaccharides exo-cellulaires et à l'absorption du rouge de Congo, montrant leur non absorbance ou leur faible absorbance a ce colorant (Vincent, 1970). Le rouge Congo est souvent rajouté aux milieux de culture pour isoler ou pour tester la purification des cultures de rhizobias (Vincent, 1970 ; Torch, 2006). Les bactéries non rhizobias utilisées, ont montré des caractéristiques différentes que ceux des rhizobias notamment la couleur rose foncée des colonies et l'absence de production des EPS. Sachant que la culture répétée des souches microbiennes est un facteur important dans la mutation génique de ces dernières (Vincent, 1970), et avec les résultats obtenus, nous pouvons dire que les bactéries utilisées dans cette étude ont pu garder la majorité de leurs caractères phénotypiques au cours des cultures successives invitro, ce qui permet de dire qu'elles peuvent être appliquées dans la recherche scientifique.

2. La majorité des bactéries nodulaires sont capable de transformer l'azote

La capacité de transformer l'azote atmosphérique en une forme plus assimilable, est testée par deux méthodes dans cette étude. Nous avons commencée par celle qui est la plus facile et la plus rapide appliquée sur le milieu liquide (TY). Cette dernière peut mettre en évidence la présence de l'activité nitrate réductase. Le résultat obtenu est vérifié et complété par une deuxième méthode appliquée sur le milieu solide NFMM contenant le BTB comme indicateur de pH et facilitant en même temps la détection des plages ou des halos. L'apparition de ces derniers autour de la colonie d'une bactérie testée montre sa possession en nitrogénase.

Le resultat du premier test indique qu'excepté la bactérie 12 (*Burkholderia terricola*), toutes les bactéries ont le pouvoir de réduire les nitrates en nitrite. En effet, l'obtention de la coloration rouge ou rose traduit la réduction de nitrate en nitrite selon la réaction suivante :



Les nitrates représentent la source la plus disponible d'azote dans la nature. Plus l'azote prendra une forme plus réduite plus il sera plus facile à être assimilable par la plupart des êtres vivants (EL- Hilali, 2006). Sachant que la nitrate réductase est l'enzyme qui joue le rôle primordiale dans l'obtention de cette forme réduite, on peut dire que les bactéries dont le résultat du premier test est positif, sont douées d'une activité de nitrate réductase. Nos résultats sont concordants avec ceux de plusieurs études, traitant le thème de la fixation biologique de l'azote. L'activité du nitrate réductase a été observée dans plusieurs associations symbiotiques entre les légumineuses et les rhizobias dont 97% de cette enzyme est localisée dans les bactéroïdes (Lucinski *et al.*, 2002).

Les résultats du deuxième test ont divisé les bactéries testées en deux groupes. Un groupe qui n'a rien montré autour des colonies et le deuxième groupe, contenant la majorité des bactéries : les souches, 2 (*Burkholderiaceae bacterium*), 3 (*Burkholderia terricola*), 4 (*Pantaecalida*), 5 (*Rhizobium giardinii*), 6 (*Ensifer meliloti 2011*), 7 (*Burkholderia terricola*), 1 (*Burkholderia terricola*), 12 (*Burkholderia terricola*), 13 (*Burkholderia terricola*), 14 (*Burkholderiaceae bacterium*) et , 15 (*M.ciceri*). Ce groupe bactérien a montré des halos très clairs autour des colonies. Ce ci témoigne leur possession en nitrogénase et ainsi leur capacité à fixer l'azote atmosphérique.

Il est bien connu que les deux genres *Mesorhizobium* et *Ensifer* sont des symbiotes des légumineuses donc sont des fixateurs d'azote (Vincent, 1970 ; Nour *et al.*, 1994). Le genre *Burkholderia* qui se trouve dans la rhizosphère du riz, est trouvé aussi fixateur d'azote (Trân Van *et al.*, 1996). Jusqu'à présent aucune étude parlant de la présence du *Burkholderia* dans les nodules des légumineuses n'est mentionnée sauf celle qui a traité le cas du pois chiche (Dekkiche *et al.*, 2017), mais malheureusement cette dernière n'a pas examiné le pouvoir fixateur d'azote de ce genre. Ce résultat obtenu dans cette présente étude montre que les bactéries appartenant à ce genre et nodulant le pois chiche possèdent un système enzymatique leur permettant d'être des fixatrices d'azote.

La nitrogénase est une enzyme qui assure la réaction suivante (Santi *et al.*, 2013):



En réalité cette enzyme est un complexe enzymatique formé de sous-unités, dont le fonctionnement est *in vitro* inhibée par l'oxygène, mais dans le processus de symbiose son fonctionnement est rendu possible dans les nodules racinaires. Il a été montré que le fonctionnement de cet enzyme est devenu aussi possible en condition aérobie à l'intérieur des racines de plantes non légumineuses par des microorganismes dites « endophytes » (Santi *et al.*, 2013 ; Sessitsch *et al.*, 2012). Il semble par ailleurs que les micro-organismes diazotrophes (fixatrices d'azote), ont de leur côté développé plusieurs stratégies de protection de leur complexe nitrogénase (Kathleen et Vanderleyden, 2000 ; Boyd *et al.*, 2015).

Suite à ces informations, nous pouvons dire que la majorité des bactéries nodulaires du pois chiche, ont un rôle dans la réduction et la fixation d'azote. Sachant que la fixation d'azote est attribué beaucoup plus aux rhizobias (Vincent, 1970, Summerfeld, 1994), il est probable que les non rhizobias contribuent dans cette activité avec une quantité moindre. Ceci devrait être vérifié par un test de nodulation et par un dosage de l'azote réduit suite à une inoculation, au moins *in vitro*.

Les autres bactéries qui ont montré un résultat négatif dans ce test, (sachant qu'elles occupent les nodules), pourraient avoir un autre rôle autre que la fixation d'azote. Ce rôle pourrait être bénéfique pour la plante hôte ou pour les autres bactéries nodulaires ou pour les deux, toute en profitant de l'azote fixé par les bactéries fixatrices d'azote et des nutriments fournis par la plante.

En plus de la sélection des bactéries fixatrices d'azote, ce test nous a permis à travers l'indicateur de pH (BTB), de déterminer la vitesse de croissance via le virage de la couleur verte du milieu vers une couleur bleu autour de la colonie après 24h.

La majorité des souches : 3 (*Burkholderia terricola*), 4 (*Pantae calida*), 5 (*Rhizobium giardinii*), 6 (*Ensifer meliloti 2011*), 8 (*Ensifer meliloti*), 9 (*Pantae agglomerans*), 11 (*Burkholderiaceae bacterium*), 12 (*Burkholderia terricola*), 13 (*Burkholderia terricola*), 14 (*Burkholderiaceae bacterium*), 16 (*Ensifer meliloti 2011*) ont acidifié le milieu dans les premiers 24h, ceci permet de dire qu'elles sont des bactéries à croissance rapide. Ce résultat est concordant avec ceux d'autres études mentionnant que les genres : *Ensifer*, *Burkholderia* sont à croissance rapide (Vincent, 1970). Ceci confirme aussi l'hypothèse soulevée dans la

première partie du travail qui mentionne que les bactéries nodulaires utilisées ont gardé leurs caractéristiques phénotypiques.

3. Certaines bactéries nodulaires sont capables de solubiliser le phosphate naturel

En plus de l'azote, l'alimentation minérale en phosphate est également une des principales activités améliorant la croissance des végétaux. Sept souches bactériennes et nodulaires du pois chiche parmi seize, sont trouvées capables de solubiliser les phosphates insolubles ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), contenus dans le milieu de culture. La diversité des bactéries nodulaires examinées dans cette étude, les préférences alimentaires des souches ainsi que l'impact de la nature du sol sur la performance des souches, nous ont incités à opter pour trois milieux différents afin de mettre en évidence leur activité solubilisantes du phosphate insoluble.

Une diversité remarquable est trouvée dans ce groupe solubilisateur : trois souches (S1, S3 et S7) sont affiliées à (*Burkholderia terricola*), une (S2) à *Burkholderiaceae bacterium*, une (S4) à *Pantae calida*, une (S6) à *Ensifer meliloti 2011* et une (S15) à *M.ciceri*, cependant la dominance en nombre revient au genre *Burkholderia*.

Puiseurs études ont mentionné les capacités solubitrices du phosphate naturel par plusieurs souches de : *Burkholderia* (Song *et al.*, 2008 ; Ghosh *et al.*, 2016), *Ensifer* (Prabha, 2013 ; Hossein, et al., 2007) et *M.ciceri*, (Zaidi *et al.*, 2010 ; Das *et al.*, 2017). Concernant la souche *Pantaecalida*, la littérature manque de données en ce thème exact, mais certains bactéries du genre *Pantae* dont *P. agglomerans* (Sulbaran *et al.*, 2008), ont montré leur capacité solubilitrice.

Le fait que l'indice de solubilisation le plus élevé est donné par la souche S15 (*M.ciceri*) est trouvé le plus important dans cette étude est très logique sachant que cette espèce est connue être le symbiote le plus spécifique au pois chiche (Nour *et al.*, 2004, 2005). Aussi Halder *et al.* (1990) ont trouvé que les souches isolées à partir de *Cicer*, sont les meilleures solubilisant du phosphate au sein des *rhizobiums*.

Les résultats obtenus dans plusieurs études ont corrélé la solubilisation du phosphate naturel avec des conditions acide du milieu, ces chercheurs expliquent cet évènement par la

production de différents types d'acides organiques (lactique, gluconique, isobutyrique, acétique, glycolique, oxalique, malonique et succinique), au cours de la solubilisation du phosphate (Kloepper *et al.*, 1989). Les micro-organismes libèrent le P par la production d'acides organiques et/ou par la sécrétion de H^+ . Par conséquent, le P peut être libéré par la substitution des protons ou sa complexation avec le Ca^{2+} (Illmer et Schinner, 1995). Tout cela va donc légèrement diminuer le pH du milieu dans lequel les bactéries sont capables de poursuivre leur croissance. Dans ce pH acide, les formes de phosphate inorganique complexées se solubilisent, les ions phosphates deviennent alors disponibles pour les racines des plantes de manière totalement naturelle, la plante va l'utiliser dans différentes réactions métaboliques, une exigence qui agit directement sur sa croissance (Illmer et Schinner, 1995).

Ce qui est très remarquable dans les résultats obtenus dans cette étude c'est que, contrairement aux cas des bactéries solubilitrices S1 et S2 (*Burkholderia*), la souche S15 (*M. ciceri*), qui a montré le plus grand indice de solubilisation, n'a pas montré une acidification du milieu lorsqu'elle solubilise la plus grande quantité en phosphate. Au contraire pour cette souche l'acidification du milieu est corrélée avec la plus grande quantité du phosphate solubilisé. Il est bien probable que le mécanisme de solubilisation de la souche *M. ciceri* est bien différent de celui adopté par les autres bactéries solubilitrices. Cette hypothèse devrait être vérifiée par d'autres études employant des méthodes plus poussées.

La plus grande quantité de phosphate solubilisée ainsi que le temps nécessaire à une solubilisation maximale du phosphate naturel, sont sans doute deux paramètres très importants pour sélectionner les souches destinées à une future inoculation au champ. Ces deux paramètres sont très remarquables chez la souche S15 (*M. ciceri*). Cette dernière a montré sa plus grande capacité solubilitrice dans le deuxième jour d'incubation en libérant 0,8g/ml du phosphate soluble. Ce résultat permet de valoriser la souche (*M. ciceri*) et lui donner un rôle primordial dans la préservation de sa plante hôte ainsi que celle du sol.

Quel que soit la quantité de phosphate soluble libéré dans le milieu, Les sept bactéries trouvées solubilisantes, dans cette étude peuvent être considérées comme des biofertilisants car elles sont capables de libérer une quantité de P supérieure à celle nécessaire à leur métabolisme, ce qui permet aux plantes d'absorber le surplus (Hameeda *et al.*,

2008 ;Kloepper *et al.*, 1989). Il est à noter aussi que parmi les autres bactéries montrant un résultat négatif de solubilisation, peuvent exister celles fiables dans cette caractéristique. En effet lors de la solubilisation, la plupart des bactéries acidifie l'espace périplasmique par oxydation directe du glucose. Les composés d'acides organiques sont libérés difficilement dans le milieu solide contrairement au milieu liquide (Nautiyal, 1999). La conséquence de ce phénomène se manifeste par la non-apparition du halo de transparence autour des colonies des souches solubilisant efficacement les phosphates sur bouillon PVK. Dans notre cas le test de solubilisation est commencé sur milieu solide, ainsi la capacité inhibitrice de certaines bactéries pourrait passer inaperçue.

4. La plus part des bactéries nodulaires présentent une activité antibactérienne et une activité antifongique

Les seize bactéries nodulaires sont testées pour leur capacité d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes par la méthode de disque. Cette dernière est souvent appliquée par les chercheurs à cause de sa simplicité et de ses résultats rapides et clairs que ce soit dans les test de l'activité antibactérienne des extraits de plantes (Haddouchi *et al.*, 2016) ou bien dans les test de l'antagonisme des bactéries (Tabak et Bensoltane, 2011).

L'activité antibactérienne mise en évidence dans cette étude n'est pas lié à un genre nodulaire déterminé. Cette activité est montrée par des genres diversifiés dont le genre *Burkholderia* s'est bien manifesté avec les autres genres des rhizobias connus (*M.ciceri* et *Ensifer meliloti*). Les rhizobias sont souvent connus par leur effet positif sur la vitalité de leur plante hôte dont l'aptitude à fixer l'azote (Fages, 1988), mais concernant leur aptitude antibactérienne la littérature n'est pas riche. La présence du genre *Burkholderia* dans les nodules du pois chiche est jusqu'à présent considérée un évènement inattendu et ainsi la comparaison des résultats obtenus dans cette étude devient difficile à impossible. Ce qui est très remarquable aussi c'est que l'activité antibactérienne détectée dans ce travail est ciblée contre les bactéries pathogènes cliniques et contre celles connues être phytopathogènes. En effet l'activité antibactérienne est détectée contre *Staphylococcus*, (par *Burkholderia terricola* ;*Burkholderiaceae bacterium* ; *Ensifer meliloti* 2011 ; *Sodali sparaeaptivus* et *Burkholderiaceae bacterium*) contre *Pseudomonas japonica* (par *Pantae calida* ; *Ensifer meliloti* 2011 ; *Pantae agglomerans* ; *Burkholderiaceae bacterium* et *M.ciceri*), contre

Citrobacter (par *Burkholderiaceae bacterium* ; *M.ciceri* et *Ensifer meliloti* 2011), contre *Bacillus amyloolithiquefaciens* (par *Burkholderia terricola* et *Burkholderiaceae bacterium*) et contre *Pantoea sp.* (par *Burkholderia terricola* et *M.ciceri*).

Enfin, les souches *Pantoea agglomerans* et *Burkholderiaceae bacterium* se sont montrés les plus fiables contre la souche pathogène P3 (*Pseudomonas japonica*). Les souches *Burkholderiaceae bacterium* et *Sodalis paraecaptivus* ont montré leur grande activité inhibitrice contre la bactérie pathogène *Staphylococcus*.

Toutes ces qualités anti pathogènes pourraient donner une explication de la grande diversité bactérienne nodulaire trouvée dans les nodules du pois chiche. Il est probable que ces bactéries nodulaires travaillent individuellement ou en synergie pour protéger les racines du pois chiche contre les bactéries pathogènes. Cet acte est mis en évidence dans plusieurs études menés sur les bactéries PGPR qui peuvent être des endophytes ou bien se trouvant dans la rhizosphère de la plante hôte (Kebe *et al.*, 2009 ; Lemanceau, 1992). L'activité inhibitrice pourrait être expliquée par la production par les bactéries antagonistes d'antibiotiques des bactériocines. Ces substances inhibitrices produites par les rhizobias et qui sont désignées sous le terme rhizobiocine (Venter *et al.*, 2001), constituent l'un des facteurs antagoniques ou de compétition responsables de la dominance de ces bactéries dans le sol (Roslycky, 1967).

En plus de l'activité antibactérienne, un effet inhibiteur antifongique des bactéries nodulaires est enregistré dans cette étude contre deux champignons (F9 et F11) de deux affiliations différentes (*Fusarium redolens* et *Alternaria graminicola*), suite à une confrontation sur un milieu gélosé. L'inhibition de la croissance fongique se traduit par la réduction du diamètre des colonies des deux champignons en présence de la bactérie nodulaire par rapport au témoin qui ne contient que le champignon.

La plus grande inhibition contre le champignon *Fusarium* est donnée par la bactérie nodulaire *Burkholderia terricola*. Celle-ci est suivie par l'inhibition donnée par la bactérie nodulaire *Burkholderiaceae bacterium*. Concernant l'activité antagoniste la plus importante, adressée contre le deuxième champignon (*Alternaria graminicola*), elle est donnée par la bactérie nodulaire *Burkholderia terricola* suivie par celle donnée par *Burkholderiaceae bacterium*. Donc dans les deux cas c'est toujours la bactérie *Burkholderia* qui montre le plus

grand effet antagoniste. Avec ce résultat le genre *Burkholderia* explique encore une fois sa présence dans le nodule du pois chiche comme protecteur de cette légumineuse contre les pathogènes, surtout que ces deux champignons sont connus comme phytopathogènes de plusieurs types de cultures telle que celle du blé (Sebihi., 2016). Des études menées par Jiménez-Fernández et al. (2011) sur le pois chiche au Liban, au Maroc, au Pakistan et en Espagne ont montré que l'infection de cette plante par le *Fusarium redolens* (F9) cause des symptômes ressemblant à un flétrissement, ainsi qu'un jaunissement des feuilles et une nécrose qui se développent à partir de la base de la tige, et sénescence prématurée, pour le champignons F 11 (*Alternaria agraminicola*) des études ont montré que le genre *Alternaria* est responsable de la rouille chez le pois chiche (Nene et al., 1996).

Les rhizobias sont souvent signalé posséder un potentiel important pour contrôler la croissance de nombreux champignons (Chao,1990) et sont considérés comme des antagonistes très efficaces contre des champignons phytopathogènes, tels que : *Pythium*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* et *Phytophthora* (Hemissi et al., 2011).

L'activité antagoniste antibactérienne et antifongique des bactéries nodulaires pourrait être réalisée directement ou indirectement. Directement par le fait que ces souches nodulaires peuvent directement parasiter les microorganismes phyto pathogènes en dégradant leurs parois grâce à des substances inhibitrices ou hydrolysantes telles que des protéines ou lipopeptides, de type fengycine. Les bactéries nodulaires peuvent agir indirectement par leur capacité à produire des substances, qui permettent d'augmenter l'effet protecteur de la plante elle-même contre les pathogènes. Dans le cas des rhizobias, l'activité antagoniste est principalement attribuée à la production d'antibiotiques, d'enzymes mycolytiques et de sidérophores dans des conditions limitantes en fer (Ongena et al.,1999; Mishra et al., 2006). Ceci est en plus de la compétition et l'induction de résistances systémiques liées à la défense des plantes (Elbadry et al., 2006). Enfin dans cette étude, nos résultats montre que les souches appartenant au genre *Burkholderia* sont les plus capable d'inhiber les champignons testés. plusieurs espèces du *Burkholderia* ayant une activité antifongique, sont montré produire des métabolites qui inhibe les champignons comme l'énacyloxine, la pyrrolnitrine, la bactoboline et les quinoléines, en plus de nouveaux composés et de nouveaux dérivés de la bactoboline (Othman, 2012).

Ces bactéries trouvées antagonistes contre les bactéries et les champignons dans cette présente étude, sont donc efficaces dans le bio contrôle de divers agents microbiens cliniques et phytopathogènes (Williams et Asher, 1996).

Conclusion

Dans une approche visant le rôle des bactéries nodulaires du pois chiche, un ensemble de test est appliqué sur seize bactéries nodulaires du pois chiche. Plusieurs points importants peuvent être tirés des résultats obtenus :

- La majorité des bactéries nodulaires possèdent des nitrate réductase et la nitrogénase, ce qui permet de conclure sur leur implication dans la réduction et la fixation de l'azote atmosphérique.
- Sept bactéries nodulaires ont montré leur capacité à solubiliser le phosphate naturel, dont trois sont testées pour la quantité en phosphate libérée. La bactérie *M.ciceri* a montré le plus grand indice de solubilisation dans le deuxième jour d'incubation et dans des conditions proches du neutre contrairement aux deux autres bactéries *Burkholderia terricola* et *Pantae calida* dont la solubilisation est enregistrée dans des conditions acides.
- Une importante activité antibactérienne des bactéries nodulaires est mise en évidence dans cette étude. La bactérie pathogène *Staphylococcus*, s'est trouvée sensible à cinq bactéries dont la dominance revient au genre *Burkholderia*. La bactérie pathogène *Pseudomonas japonica* s'est trouvé sensible à cinq bactéries nodulaires aussi mais la dominance revient au genre *Pantea*. Les trois genres *Burkholderia* ; *M.ciceri* et *Ensifer melilotise* sont montré très antagonistes contre la bactérie pathogène *Citrobacter*. La bactérie pathogène *Bacillus amylolique faciens* a montré sa grande sensibilité devant le genre *Burkholderia* et enfin ce dernier avec le genre *M.ciceri* ont montré leur antagonisme contre la bactérie pathogène *Pantoea sp.*
- La majorité des bactéries nodulaire a pu inhiber la croissance mycélienne de deux champignons différents en genres (*Fusarium redolens* et *Alternaria graminicola*). Dans les deux cas, la plus grande inhibition est donnée par la bactérie nodulaire *Burkholderia terricola*.

Les activités biologiques des bactéries nodulaires mises en évidence dans cette étude permettent de les classer dans la catégorie des microorganismes bénéfiques. Ces bactéries

seraient donc efficaces dans le bio contrôle de divers agents microbiens cliniques et phyto pathogènes.

Les résultats trouvés dans cette étude constituent une base de données pour chacune des activités biologiques examinées. Il est souhaitable de s'approfondir dans chacune de ces activités et comprendre le mécanisme adopté pour chacune des souches utilisées dans cette étude. Il est aussi souhaitable de tester ces bactéries pour d'autres activités biologique telles que leur tolérance aux métaux lourds, la production du AIA (l'acide indole acétique) et des sidérophores. Des essais sur champ permettraient de bien valoriser les capacités de ces bactéries.

Références bibliographiques

- Abbaset Aslam M., Abbas Q., Mohy-ud-Din K., Ullah G., 2010.** Réponse du haricot mungo (*Vignaradiata*) aux engrais phosphatés sous un climat aride. *Le Journal des Sciences Animales et Plantes*. pp 83-86.
- Allali H. et Boussouar K., 2007.** Etude des besoins en eau de la culture de pois chiche (*Cicer arietinum*) dans la région de Sidi Bel Abbés, mémoire de fin d'études de Biologie et physiologie végétale.
- Bashan Y., Puente M.E., de Bashan L.E., et Hernandez J.P., 2008.** Environmental use of plant growth-promoting bacteria. In A.E. Barka et C. Clément. *Plant-Microbe interactions*. pp 69-93.
- Beddar N., 1990.** Influence de l'effet inoculation par différentes souches de rhizobium sur l'élaboration du rendement chez le pois chiche (*Cicer arietinum* L.), Variété ILC 3279. Mémoire d'ingénieur agronome, Sétif. pp 81.
- Benhamou N., Chet I., 1996.** Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultra structural and cyto chemical aspects of the interaction, 86 (4) pp 405-416.
- Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A. et Squartini A., 2004.** Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst. Appl. Microbiol*, 27 pp 462-468.
- Ben Mbarek K., Boujelben A., Boubaker M. et Hannachi C., 2009.** Criblage et performances agronomiques de 45 génotypes de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) soumis à un régime hydrique limité. *Biotechnologies Agronomique et Sciences Environnementales*, 3 pp 381-393.
- Berger J., Abbo S. and Turner N.C., 2003.** Ecogeography of annual wild *Cicer* species : The poor state of the world collection. *Plant Genetic Resources. CropSci*, 43 pp1076-1090.
- Beringer J E., 1974.** R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J gen Microbiol*, 84, pp 188-198.
- Bouznad Z., Maatogui M.E.H. et Labdi M., 1996.** Importance et distribution géographique des maladies fongiques des légumineuses alimentaires en Algérie. In : Ezzahiri B., Lyamany

A., Farih A. et El Lyamany M. Symposium régional sur les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires IMP, El Maarif Al Djadida, Rabat, Maroc. pp 13-19.

Boyd ES., Costas AM., Hamilton TL., Mus F, Peters JW., 2015. Evolution of molybdenum nitrogenase during the transition from anaerobic to aerobic metabolism, *J Bacteriol*, 197 pp. 1690-1699.

Busby R.R., Rodriguez G., Gebhart DL., Yannarell AC., 2016. Les espèces de *lepedeza* dans les nodules racinaires par rapport à l'envahisseur coexistant, *L. Cuneata*. *Plant soil*. 401 pp 427-236.

Casida L E Jr., 1982. *Ensifer adhaerens*, gen. nov., sp. Nov: A bacterial predator of bacteria in soil. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 32 pp 339-345.

Celador-Lera L., Esther M., Alvaro P., Jose M., Encarna V., Raul R., 2017. *Rhizobium zae* sp. nov., isolated from maize (*Zea mays* L.) roots, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67 pp 2306-2311.

Chao WL., 1990. Antagonistic activity of *Rhizobium* spp. against beneficial and plant pathogenic fungi. *Lett Appl Microbiol*, 10 pp 213-215.

Chen C., Kalb VF., Turi TG., Loper JC., 1988. Primary structure of the cytochrome P450 lanosterol 14 alpha-demethylase gene from *Candida tropicalis*. *DNA*, 7(9) pp 617-26.

Chen, W.X., Tan, Z.Y., Gao, J.L., Li, Y., Wang, E.T., 1997. *Rhizobium hainanense* sp. Nov., isolated from tropical legumes. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 47(3) pp 870-873.

Cherif H., 2014. Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides. Thèse de doctorat, Université de Ferhat Abbas .Algérie, 134p

Choi CH., Kim TL., Kim BC., Shin SJ., Lee SK., Kim WH., Kim HS., 2006. Anti *Saccharomyces cerevisiae* antibody in intestinal Behçet's disease patients: relation to clinical course. *Dis Colon Rectum* , 49(12) pp 1849-59

Chiarini L., Bevivino A., Dalmastrri C., Tabacchioni S et Visca P., 2006. *Burkholderia cepacia* complex species : health hazards and biotechnological potential. *Trends in Micribiology*. 14(6) pp 277-286.

Ciqual., 2013 in : Boukraâ D., 2016. Effet de l'acide salicylique sur les composantes du rendement et la résistance biotique et abiotique chez *Cicer arietinum*. Thèse de Doctorat, Université de Mascara. pp 16.

Cohen A.C., Travaglia C.N., Bottini R et Piccoli P.N., 2009. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. Botany. 87(5) pp 455-462.

Crété P., 1965. Précis de botanique. Systématique des angiospermes. Tome II. pp 243.

Das K., Mahendra VSR., Anil KS., and Radha P., 2017. Development of *Mesorhizobium ciceri*-Based Biofilms and Analyses of Their Antifungal and Plant Growth Promoting Activity in Chickpea Challenged by Fusarium Wilt. Indian J Microbiol. pp 48–59.

Dekkiche S., 2017. Diversités taxonomique et moléculaire des rhizobiums nodulant le pois chiche (*Cicer arietinum L.*), dans l'Est Algérien. Thèse de Doctorat, Université des frères Mentouri Constantine-1. pp 119-132.

Dekkiche S., Benguedouar A., Sbabou L , Taha K., Filali-Maltouf A . and Béna G., 2017. Chickpea (*Cicer arietinum*) is nodulated by unexpected wide diversity of *Mesorhizobium* species in Eastern Algeria, Archives of Agronomy and Soil Science ,64(2).

De Lajudie Ph., Willems A., Pot B., Dewettinck O., Maestrojuan G., Neyra M., Collins M.D., Dreyfus B., Kersters K., Gillis M. (1994). «Polyphasic taxonomy of rhizobia : Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium sahe/i* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. Nov», Int. J. Syst. Bacteriol, 44 pp 715-733.

De Lajudie P., Willems A., Nick G ., 1998. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mezorhizobium plurifarium* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol, 48 pp 369-382.

Dipak P, Sankar NS., 2016. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. Annals of agrarian science, I, 7.

Djenni F., 2003. Etude d'une structure de peuplement pour l'amélioration du rendement de la culture du pois chiche dans la zone subhumide. Céréaliculture, revue technique et scientifique, ITGC, 39.

- Dobereiner J. and Day J M., 1976.** Associative symbiosis in tropical grasses : Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In : Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation, Washinton State University Press, Pullman, USA, 2 pp 518-538.
- Doyle J J., Luckow M A., 2003.** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. Plant Physiol. 131 pp 900-10.
- Duranti M., and Gius C., 1997.** Legume Seeds: Protein Content and Nutritional Value. Field Crops Research, 53 pp 31- 45.
- Elbadry M., Taha R M., Eldougoug K A., Gamal-Eldin H., 2006.** Induction of systemic resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) to bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) via seed bacterization with plant growth promoting rhizobacteria. J. Plant Dis Protect, 113(6) pp 247-251.
- El-Hilali I., 2006.** La symbiose *Rhizobium-Lupin* : Biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de doctorat de l'Université Mohammed V Agdal Rabat. Maroc.
- Fages J., Daniel M., 1988.** Isolement de bactéries rhizosphériques et effet de leur inoculation en pots chez Zeamays. Agronomie, EDP Sciences, 8 (4) pp 309-314.
- Ghosh R., Barman S., Mukherjee R., Mandal NC., 2016.** Role of phosphate solubilizing Burkholderia spp. for successful colonization and growth promotion of *Lycopodium cernuum* L. (Lycopodiaceae) in lateriticbelt of Birbhum district of West Bengal, India. 183 pp 80-91.
- Giroux M., Cantin J.M., Rivest M. et Tremblay G., 2002.** L'évolution des teneurs en phosphore dans les sols selon leur fertilité, leur richesse en phosphore et les types de sol. Colloque sur le phosphore: une gestion éclairée. Drummonville.
- Graham PH et Vance CP., 2003.** Legumes: importance and constraints to greater use. Plant Physiol., 131 pp 872-877.

Greathead D.J., Kooyman C., Launois-Luong M.H. et Popov G.B., 1994. Les ennemis naturels du Sahel. Collection acridologie opérationnelle N° 8. CILSS/DFPV, Niamey, Bp 12625. Niger.

Guignard J.L., Dupont F., 2005. Botanique. 13ème Edition Masson.

Haddouchi F., Zerhouni K., Sidi-Yakhelef A et Chaouche T M., 2016. Evaluation of antimicrobial activity of different extracts of *Helichrysum stoechas* subsp. *Rupestre*. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, 85 pp 152 - 159.

Halder A K., Mishra A K., Bhattacharya P .and Chakrabarty P K., 1990. Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. Indian J. Microbiol., 30 pp 311-314.

Hamadache A et Ait Abdallah F., 1998. Lutte contre les adventices en culture du Pois chiche d'hiver : un facteur déterminant pour la valorisation du matériel végétal et du semis précoce .céréaliculture, N°33 ISSN pp 1011-9582.

Hamadache A. et Kheddam M., 1999. Contraintes au développement durable des légumineuses alimentaires en Algérie. In : Labdi M., Maatougui E.H., Bouznad Z., Benabdellik. et Bensedik K. Les légumineuses alimentaires en Algérie : Situation actuelle et perspectives. Ed. ITGC, El-Harrach, Algérie. pp 76-83.

Hameeda B G., Harini O P., Rupela S P W and Gopal R ., 2008. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. Microbiological Research, 163 pp 234-242.

Harwood, JAC., Mullins L., Payne A R., 1965. Stress softening in natural rubber vulcanizates, Part II. J. Appl. Polym. Sci, 9 pp 3011-3021.

Hemissi I., Mabrouk Abdi N., Bouraoui M., Saidi M., Sifi B., 2011. Effects of some *Rhizobium* strains on chickpea growth and biological control of *Rhizoctonia solani*. Afr J Microbiol Res, 5 pp 4080-4090.

Herman R P., Provenico K., Torrez R., Seager G M ., 1994. Seasonal and special population dynamics of the nitrogen-efficient guild in a desert bajada grassland. Applied and Environmental Microbiology, 60(4) pp 1160-1165.

Hossein A., Alikhani HA; Antou H et SalehRastin N., 2007. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. In Effect of certain phosphate-solubilizing bacteria on root-knot nematode disease of mungbean pp.35-41.

Illmer P., and Schinner E.,1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates – solubilization mechanisms. Soil Biol. Biochem. 27, pp 257-263.

Itgc., 2003. «Céréaliculture » revue de l'Institut Technique des Grandes Cultures N°40.

Jarvis B D W., Van Berkum P., Chen W X., Nour S M., Fernandez M P., Cleyet-Marel

J C., Gillis M., 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. Int J Syst Bacteriol, 47 pp 895-898.

Jackson, M. L. 1973. Soil Chemical Analysis, Prentice Hall of India (P.) Ltd., New Delhi.

Jimenez-Fernandez D., Navas-Cortes JA., Montes-Borrego M., JiménezDíaz RM. et Landa BB., 2011. Molecular and pathogenic characterization of *Fusarium redolens*, a new causal agent of *Fusarium* yellows in chickpea. Plant Dis, 95 pp 860-870.

Kathleen M et Jos V ., 2000. « The "oxygen paradox" of dinitrogen-fixing bacteria », Biol Fertil Soils, 30. pp 363-373.

Kebe I B., Joseph M., Kouamé F.,Prakash K., Gary S et Severin A ., 2009. Isolement et identification de microorganismes indigènes de cacaoyères en Côte d'Ivoire et mise en évidence de leurs effets antagonistes vis-à-vis de *Phytophthora palmivora*, agent de la pourriture brune des cabosses. Sciences et Nature,6 N°1 pp 71 – 82.

Kechache K., 2005. Contribution à l'étude de l'effet de la fertilisation phosphatée à base des engrais SPP 20%et TSP 46% sur le pois chiche, mémoire de fin d'étude.

Kloepper J.W. , Lifshitz R., Zablutowicz RM ., 1989. Free-living bacterial in soil inocula for enhancing crop productivity. Trends Biotechnol pp. 39-43

Kloepper J.W., Ryu C.M. and Zhang S.A., 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus spp.* Phytopathology. 94(11) pp 1259-1266.

- Kouas S., Louche J., Debez A., Plassard C., Drevon J.J., Chedly A., 2009.** L'effet de la carence en phosphore sur la phosphatase acide et des activités de phytases dans haricot commun (*Phaseolus Vulgaris* L.) sous la fixation symbiotique de l'azote.
- Larue T. A et Patterson T G., 1981.** How much nitrogen do legumes fix ? *Advan in Agronom.* pp. 15; 34-38.
- Lemanceau P.,1992.** Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas spp* fluorescents. *Agronomie, EDP Sciences*, 12 (6) pp 413-437.
- Lindstrom K., 1989.** *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int J. Syst Bacteriol.* 39 pp 365-367.
- Lodwig EM., Hosie AHF., Bourdès A., Findlay K., Allaway D., Karunakaran R., Downie JA. et Poole PS., 2003.** Amino-acid cycling drives Nitrogen fixation in the legume-rhizobium symbiosis. *Nature.*, 422 pp 722-726.
- Lucinski R., Polcyn W. et Rotayczak L., 2002.** Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium-legumes*. *Acta Biochimia Polonia*, 49 (2) pp 537-546.
- Martinez-Romero E., Segova L., Mercante F. M., Franco A.A., Graham P. et Pardo M. A., 1991.** *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena spp.* trees. *Int. J. Syst Bacteriol.* 41pp 417-426.
- Mishra R P N., Singh R K., Jaiswal H K., Kumar V., Maurya S., 2006.** *Rhizobium*-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). *Curr Microbiol*, 52 pp 383-389.
- Morel C., Tunney H., Plenet D. and Pellerin S., 2000.** Transfer of phosphate ion between soil and solution: perspective in soil testing. *J. Environ. Qual.* 29 pp 50-59.
- Muehlbauer F. J. and Rajesh P. N., 2008.** Chickpea, a common source of protein and starch in the semi-arid tropics. PH. Moore, R Ming (eds.) *Genomics of tropical crop plants*.
- Nautiyal CS., 1999.** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*, 170 pp 265-270.

Nguyen K M., 1992. Status and distribution of soil sulphur fractions, total nitrogen and organic carbon in camp and non-camp soils of grazed pastures supplied with long-term superphosphate M. L, 14, pp 181–190.

Nour S H., Cleyet-Marel J.C., Normand P. and Fernandez M.P.,1995. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. Int J Syst Bacteriol, 45 pp 640-648.

Nour S.H., Fernández M.P., Normand P. and Cleyet-Marel J.C., 1994. *Rhizobium ciceri*, sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). Int J Syst Bacteriol, 44 pp 511- 522.

O’Neil C.E., Nicklas T.A. and Fulgoni V.L., 2014. Chickpeas and Humus are associated with Better Nutrient Intake, Diet Quality, and Levels of Some Cardiovascular Risk Factors: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2010. Nutrition and Food Sciences, 4(1) pp 1-7.

Ongena M ., Daayf F., Jacques P., Thonart P., Benhamou N., Paulitz TC ., Cornélis P., Koedam N. and Bélanger RR., 1999. Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent pseudomonads; predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. Plant Pathol, 48 pp 66-76.

Othman B B., 2012. *Burkholderia cepacia* complex bacteria and their antimicrobial activity. Thesis of Philosophiae Doctor. pp 1-289.

Peix A., Ramirez-bahena M.H., Velázquez E., Bedmar E J., 2015. Associations bacteriennes avec des légumineuses. Crit.Rev. Plant Sci .34 : 17-42.

Petr S., Clarice J C., Mike J A., Nigel M., Hanno S., Matthew W B., Jens B., Stephanie L G., Matthew N N., Naghmeh B., Tomáš V., Cengiz T., Rachit K S., Manish R., Manish K P., Jinguo H., Ying H L., Li X W., Yong G., Li J Q., Robert J R. et Rajeev K V., 2015. Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding, Critical Reviews in Plant Sciences, 34 pp 1-3, 43-104.

Pikovskaya RI., 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. Microbiology, 17 pp 362–370.

Prabha C., Maheshwari DK. and Bajpai VK .,2013. Diverse role of fast growing rhizobia in growth promotion and enhancement of psoralen content in *Psoralea corylifolia* L. Pharmacogn Mag. 9(Suppl 1) pp 57-65.

Quan Z X., Bae H S., Baek J H., Chen W F., Im W T., and Lee S T., 2005. Rhizobium daejeonense sp. Nov. isolated from a cyanide treatment bioreactor. Int. J. Syst. Evol.Microbiol, 55 pp 2543-2549.

Raven P.H., Evert R.F. et Eichlorn S.E., 2000. Biologie végétale. 6ème Edition de boeck, Paris.

Reeves S., Lewin S., Espin S. and Zwarenstein M., 2010. Interprofessional team work for health and social care. Oxford, UK: Blackwell-Wiley.

Rfaki A, Nassiri L, Ibijbijen J., 2015. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of faba bean (*Vicia faba* L.) in Meknes region, Morocco. Br Microbiology Research Jornal international, 6 pp 247-254.

Roslycky E B., 1967. Bacteriocin production in the rhizobia bacteria. Canadian Journal of Microbiology, 13 pp 431-432.

Sanon A., Gauthier N., Huignard J., 1999. Competition interspécifique entre deux espèces de parasitoids de larves de Bruchidae, *Eupelmus vuilleti* et *Dinarmus basalis* .Importance de la densité et de la qualité des hotes sur le succès parasitaire des deux espèces. Ann Soc Entomol, 35 pp 421-426.

Santos J.G., Pollak E., Rexer K.H., Molnar L., Wegener C., 2006. Morphology and metamorphosis of the peptidergic Va neurons and the median nerve system of the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. Cell Tissue Research. 326(1) pp 187-199.

Santi C., Bogusz D., Franche C., 2013. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. Ann Bot, 111 pp 743-767.

Sebihi FZ., 2008. Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (B.N.L) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum*. Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri de Constantine, faculté des sciences de la nature et de la vie. pp 121.

Sebihi Z., 2016. Effet PGPR des souches de *Pseudomonas fluorescens* isolées de la rhizosphère du blé cultivé dans la région de Constantine. Informations et ressources scientifiques sur le développement des zones arides et non arides. pp 78-85.

Segovia L., Young J.P., Martinez -Romero E., 1992. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar Phaseolitype 1 strains as *Rhizobium etlisp.* nov. Int. J.Syst Bacteriol, 43 pp 374-377.

Sessitsch A., Hardoim P., Doring J., Weilharter A., Krause A., Woyke T. .,2012. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by meta genomic analysis. Mol Plant Microbe Interact, 25 pp 28-36.

Singh K B., 1997. Chickpea (*Cicer arietinum* L). Field Crops Research, 53 pp 161-170.

Song O; Seung-Jin L; Yong-Seok L; Sang-Cheol L ; Keun-Ki K ; Yong-Lark C .,2008. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA 23 isolated from cultivated soil. Brazilian Journal of Microbiology, 39 pp151-156

Starnes R.L., Liu C.L. et Marone P.G., 1993. History, use and future of microbial insecticides. Amer. Entomol., 39 PP 83-91.

Stoyanova M., Pavlina I., Moncheva P.et Bogatzevska N., 2007. Biodiversity and incidence of *Burkholderia* species. Biotechnol and Biotechnol. pp 306-310.

Summerfield R.J., Minchin F.R., Roberts E.H. and Hadley P., 1979. The effects of photoperiod and air temperature on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum*L.). Proceedings international workshop on chickpea improvement. Ed. ICRISAT. pp 121-144.

Tabak S et Bensoltane A., 2011. L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastro duodénales . Nature and Technologie. pp 71-79.

Torche A., 2006. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Thèse de Magister. Département de Biologie. Université de Constantine.

Trân Van V., Mavingui P., Berge O., Balandreau J., Heulin T ., 1994. Promotion de croissance du riz inoculé par une bactérie fixatrice d'azote, *Burkholderia vietnamiensis*, isolée d'un sol sulfaté acide du Viêt-nam. Agronomie, 14 pp 697-707.

- Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M.L., Touraine B., Moëgne-Loccoz Y., Muller D., 2013.** Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning, *Front Plant Sci.* 4(356) pp 1-19.
- Valverde A., Igual J M., Peix A., Cervantes E., Velazquez E., 2006.** *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *Int J Food Microbiol*, 56 pp 2631-2637.
- Van Berkum P., Beyene D., Bao G P., Campbell T A., and Eardly B D., 1988.** *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 48(1) pp 13-22.
- Vance C.P., 2001.** Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiol.* 127 pp 390-397.
- Vance C.P., Uhde-Stone C., Allan D.L., 2003.** Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a non renewable resource. *New Phytologist*. 157 pp 423-447.
- Vander Maessen J.C., 1972.** *Cicer* L, a monograph of the genus, with special reference to the chickpea (*Cicer arietinum* L), its ecology and cultivation. Meddling land bouw bog school wagenigen, Nederland. pp 72.
- Venter A P., Twelker S., Rosin I J. et Hynes M F., 2001.** Analysis of the genetic region encoding a novel rhizobiocin from *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* strain 306. *Can. J. Microbiol*, 47(6) pp 495-502.
- Venturi V., Friscina Bertani I., Devescom G. et Aguilar C., 2004.** Quorum sensing in the *Burkholderia cepacia* complex. *Research Microbiol*. 155(4) pp 238-244.
- Vincent J M., 1970.** A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBM Handbook no 15 Brackwell OXFORD, pp1-64.
- Wang E T., Van Berkum P., Beyene D., Sui X H., Chen W X., Martinez-romero E., 1998.** *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 48 pp 687-699.

Wery J., 1990. Adaptation to frost and drought stress in chickpea and implications in plant breeding. In: Saxena M.C., Cubero J.I. and Wery. Presentstatus and future prospects of chickpea crop production and improvement in the Mediterranean countries, Options Méditerranéennes, Série Séminaires 9, CIHEAM, Paris. pp 77-85.

Williams G E. et Asher M J C., 1996. Selection of rhizobacteria for the control of *Pythium ultimum* and *Aphanomyces cochlioides* on sugar-beet seedlings. *Crop Prot*, 15 pp 479-486.

Young, J. M. (2003). The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination ‘*Sinorhizobium adhaerens*’ (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53pp 2107-2110.

Zaidi A ; Mohammad O ; Munees A ; Ees A and Saghir Khan M .,2010. Role of Phosphate-Solubilizing Bacteria in Legume Improvement. In *Microbes for Legume Improvement*. pp.273-292.

Zakhia F., de Lajudie P., 2006. La taxonomie bactérienne moderne: revue des techniques—application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). *Can. J. Microbiol*, 52 pp 169-181.

Zakhia F., Jeder H., Domergue O., Willems A., Cleyet-Marel J.C., Gillis M., Dreyfus B., and de Lajudie P., 2004. Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Syst. Appl. Microbiol.* pp 380-395.

Zohary D. et Hopf M., 1988. Domestication of plants in the old world, Oxford University. PRESS.

Sites web:

<http://www.fao.org> (consulté le : 01/06/2019)

<https://www.fellah-trade.com/fr/filiere-vegetale/fiches-techniques/pois-chiche?fbclid=IwAR0zuCcajoRt2EmRrhjFDvGgUuHTi2dnQWrAS2q2gNgVBHQxPKiC14ktBhs> (consulté le : 15/04/2019)

<https://www.futura-sciences.com/planete/> (consulté le : 05/05/2019)

https://www.gastronomiac.com/glossaire_des_produits/pois-chiche-histoire-du-pois-chiche-production-mondiale-et-tradition/ (consulté le : 28/06/2019)

<http://www.ikonet.com/fr/alimentation/aliment/info/index/pois-chiche> (consulté le : 1/06/2019)

<http://www.inra.fr/Chercheurs-etudiants/Systemes-agricoles/Tous-les-dossiers/Le-poids-des-legumineuses/Legumineuses-et-nutrition> (consulté le : 08/06/2019)

<https://www.notre-planete.info> (consulté le : 08/06/2019)

<https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia> (consulté le : 30/06/2019)

<http://www.terresunivia.fr/cultures-utilisation/les-especes-cultivees/pois-chiche> (consulté le : 02/04/2019)

Annexes

ANNEXE1 -Milieux de culture et solutions utilisés**Les constituants des milieux utilisés en g/l****Gélose nutritive (GN)**

Peptone	10
Extrait de levure	3
Extrait de viande	3
Chlorure de sodium	5
Agar-Agar	15
Eau distillée.....	1000ml
pH	7,2

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Yeast Mannitol Broth (YMB) (Vincent, 1970)

Mannitol	10
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ -7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
Extrait de levure	0,5
Eau distillée.....	1000 ml
pH	6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Composition de milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) en g/l (Vincent, 1970)

YMB.....	1000ml
Agar.....	18
pH.....	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Composition de milieu YMA + Rouge Congo en g/l (Vincent, 1970)

YMB.....	1000ml
Solution de rouge Congo	10ml (0,25 g /100 ml)
Agar	18
pH	6.8

Solution de Rouge Congo

Rouge Congo.....	2,5
Eau distillée	100 ml

Tryptone Yeast (TY) (Beringer, 1974)

Tryptone.....	5.0
Yeast extract	3.0
CaCl ₂ - H ₂ O.....	0.87
pH	7.0 ± 0.2
Eau distillée.....	1000 ml
Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.	

Mileu de Pikovskaya (PVK) (Pikovskaya, 1948)

Glucose	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
MgSO ₄ -7H ₂ O	0,1
NaCl	0,2
KCl	0,2
MnSO ₄ ,7H ₂ O	0,002
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,002
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5

Agar-Agar15

Eau distillée..... 1000 ml

pH7

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Milieu NBRIP (National Botanical Research Institut's Phosphate medium) (Nautiyal, 1999)

Glucose10

MgCl₂, 6H₂O 5

Ca₃ (PO₄)..... 5

MgSO₄, 7H₂O..... 0,25

KCl 0,2

(NH₄)₂ SO₄0,1

pH 7

Eau distillée..... 1000 ml

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Milieu YED (Yeast Extract Dextrose)

Yeast Extract10

Glucose20

Ca₃ (PO₄)..... 5

Agar-Agar20

pH 7

Eau distillée..... 1000 ml

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Milieu NF-MM (Nitrogène-Free- Malate- Mannitol-Medium) (Herman et al, 1994)

KH ₂ PO ₄	0,4
K ₂ HPO ₄	0,1
MgSO ₄ -7H ₂ O	0,097
NaCl	0,1
CaCl ₂	0,0196
FeCl ₃ -6H ₂ O.....	0,017
NaMoO ₄ - 2H ₂ O	0,002
Extrait de levure	0,001
L-Acide Malique	3,58
Mannitol	5
Agar-Agar	15
Eau distillée.....	1000 ml
pH	7

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

ANNEXE II –Les tableaux détaillés des résultats

Tableau 6 : Diamètre de colonie, des halos et de la zone colorée des souches nodulaires

Souche	Résultat	Ø de Colonie R1(mm)	Ø de Colonie R2(mm)	Moyennes de colonies (mm)	Ø d'halo R1(mm)	Ø d'halo R2(mm)	Moyennes des halos (mm)	Diamètre de la zone colorée (mm)
1	-	3	1	2 ± 1	-	-	-	-
2	+	1	1	1 ± 0	3	3	3 ± 0	2
3	+	1	1	1 ± 0	5	3	4 ± 1	3
4	+++	1	3	2 ± 1	9	9	9 ± 0	7
5	++	1	1	1 ± 0	8	4	6 ± 2	5
6	++	3	1	2 ± 1	4	4	4 ± 0	2
7	+	2	2	2 ± 0	6	4	5 ± 1	3
8	-	1	3	2 ± 1	-	-	-	-
9	-	1	1	1 ± 0	-	-	-	-
10	++	1	1	1 ± 0	5	5	5 ± 0	4
11	-	3	1	2 ± 1	-	-	-	-
12	+	1	1	1 ± 0	5	3	4 ± 1	3
13	+	5	1	3 ± 2	4	4	4 ± 0	1
14	+++	4	2	3 ± 1	9	7	8 ± 1	5
15	+	1	1	1 ± 0	6	2	4 ± 2	3
16	-	2	2	2 ± 0	-	-	-	-

Ø : Halo / R : Répétition

YED	d'halo R1 (mm)																	
	Ø d'halo R2 (mm)	6	5	2	3	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	3	-	
	Moyenne d'halo (mm)	7 ± 1	4,5 ± 0,5	2,5 ± 0,5	3 ± 0	-	-	5 ± 2	-	-	-	-	-	-	-	2 ± 1	-	
NBRIP	Ø de Colonie R1 (mm)	1	2	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	
	Ø de Colonie R2 (mm)	1	2	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	
	Moyenne de colonie (mm)	1 ± 0	2 ± 0	-	3 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 ± 0	-	
	Ø d'halo R1 (mm)	3	7	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	
	Ø d'halo R2 (mm)	3	5	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	
	Moyenne du halo (mm)	3 ± 0	6 ± 1	-	8,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,5 ± 0,5	-	

Tableau 12 : Diamètre de croissance mycélienne

Les souches	Champignon F9						Champignon F11							
	Résultat	Ø de disque R1 (mm)	Ø de disque R2 (mm)	Moyennes des disques (mm)	Croissance R1 (mm)	Croissance R2 (mm)	Moyennes de croissance (mm)	Résultat	Ø de disque R1 (mm)	Ø de disque R2 (mm)	Moyennes des disques (mm)	Croissance R1 (mm)	Croissance R2 (mm)	Moyennes de croissance (mm)
Témoin		7	8	7,5 ± 0,5	34	27	30,5 ± 3,5		5	4	4,5 ± 0,5	33	36	34,5 ± 1,5
1	+	6	10	8 ± 2	18	22	20 ± 2	+	5	5	5 ± 0	27	26	26,5 ± 0,5
2	+	8	9	8,5 ± 0,5	23	22	22,5 ± 0,5	+	5	4	4,5 ± 0,5	27	23	25 ± 2
3	-	10	9	9,5 ± 0,5	35	37	36 ± 1	+	4	4	4 ±0	35	29	32 ± 3
4	-	10	9	9,5 ± 0,5	37	38	37,5 ± 0,5	+	4	4	4 ± 0	32	29	30,5 ± 1,5
5	+	9	7	8 ± 1	30	30	30 ± 0	+	4	4	4 ± 0	30	29	29,5 ± 0,5
6	-	8	9	8,5 ± 0,5	30	42	36 ± 6	-	4	5	4,5 ± 0,5	33	36	34,5 ± 1,5
7	+	7	8	7,5 ± 0,5	21	28	24,5 ±	+	5	5	5 ±	24	26	25 ±

							3,5				0			1
8	-	7	6	6,5 ± 0,5	38	39	38,5 ± 0,5	+	5	4	4,5 ± 0,5	28	25	26,5 ± 1,5
9	+	6	6	6 ± 0	23	21	22 ± 1	+	4	4	4 ± 0	29	31	30 ± 1
10	-	9	8	8,5 ± 0,5	31	31	31 ± 0	+	4	4	4 ± 0	24	28	26 ± 2
11	+	9	8	8,5 ± 0,5	27	25	26 ± 1	+	5	5	5 ± 0	34	29	31,5 ± 2,5
12	-	9	9	9 ± 0	33	46	39,5 ± 6,5	+	3	5	4 ± 1	30	35	32,5 ± 2,5
13	+	10	9	9,5 ± 0,5	22	28	25 ± 3	+	5	4	4,5 ± 0,5	32	28	30 ± 2
14	+	7	7	7 ± 0	22	22	22 ± 0	+	5	5	5 ± 0	26	27	26,5 ± 0,5
15	+	9	10	9,5 ± 0,5	29	26	27,5 ± 1,5	+	4	5	4,5 ± 0,5	26	28	27 ± 1
16	+	8	9	8,5 ± 0,5	25	24	24,5 ± 0,5	+	4	4	4 ± 0	31	27	29 ± 2

Tableau 13 : Croissance et pH des souches solubilitrices en fonction du temps.

Jours	Souche	DO de croissance				PH				DO de P. libre			
		R.1	R.2	R.3	Moyenne	R.1	R.2	R.3	Moyenne	R.1	R.2	R.3	Moyenne
1	1	1,53	1,25	1,18	1,32 ± 0,14	6,7	6,9	6,5	6,7 ± 0,13	0,12	0,32	0,33	0,26 ± 0,09
	4	0,98	1,29	0,83	1,03 ± 0,17	6,8	6,9	6,1	6,6 ± 0,33	0,22	0,11	0,16	0,16 ± 0,04
	15	1,49	1,89	1,37	1,58 ± 0,20	7,0	6,6	6,7	6,8 ± 0,15	0,23	0,14	0,12	0,16 ± 0,04
2	1	0,86	1,25	1,45	1,19 ± 0,22	6,7	7,0	7,0	6,9 ± 0,13	0,36	0,16	0,43	0,32 ± 0,10
	4	1,34	1,54	1,14	1,34 ± 0,13	6,6	7,1	7,0	6,9 ± 0,20	0,22	0,20	0,30	0,24 ± 0,04
	15	1,34	1,66	1,16	1,39 ± 0,18	6,4	7,1	7,0	6,8 ± 0,29	0,23	0,41	0,39	0,34 ± 0,07
3	1	1,02	0,83	1,17	1,00 ± 0,12	4,2	4,4	4,1	4,2 ± 0,11	0,13	0,28	0,27	0,23 ± 0,06
	4	1,00	0,19	0,41	0,53 ± 0,31	4,3	4,1	4,7	4,3 ± 0,22	0,28	0,09	0,11	0,16 ± 0,08
	15	1,80	1,56	1,87	1,74 ± 0,12	6,0	6,1	6,4	6,2 ± 0,15	0,18	0,21	0,15	0,18 ± 0,02
4	1	1,16	0,65	0,9	0,90 ± 0,17	4,8	4,9	5,0	4,9 ± 0,07	0,28	0,28	0,24	0,27 ± 0,02
	4	0,04	0,37	0,78	0,40 ± 0,25	5,2	5,0	4,9	5,0 ± 0,11	0,10	0,11	0,13	0,11 ± 0,01
	15	1,73	1,96	1,9	1,86 ± 0,09	4,8	6,7	7,0	6,1 ± 0,91	0,13	0,29	0,30	0,24 ± 0,07
5	1	0,75	1,24	0,95	0,98 ± 0,17	5,4	6,6	4,4	5,5 ± 0,75	0,15	0,22	0,11	0,16 ± 0,04
	4	0,67	0,67	0,63	0,66 ± 0,02	7,8	6,0	6,3	6,7 ± 0,73	0,18	0,25	0,09	0,17 ± 0,05
	15	0,88	1,22	0,6	0,90 ± 0,21	5,6	5,4	7,0	6,0 ± 0,67	0,20	0,14	0,18	0,17 ± 0,02
6	1	1,02	1,27	1,06	1,12 ± 0,10	6,1	7,0	5,8	6,3 ± 0,47	0,33	0,19	0,15	0,22 ± 0,07
	4	0,98	1,28	1,13	1,13 ± 0,10	7,6	5,9	5,5	6,3 ± 0,84	0,20	0,13	0,14	0,16 ± 0,03
	15	1,47	1,62	1,38	1,49 ± 0,09	6,4	6,6	5,9	6,3 ± 0,27	0,15	0,29	0,19	0,21 ± 0,05
7	1	1,06	1,23	0,96	1,08 ± 0,10	6,7	6,0	5,8	6,2 ± 0,35	0,09	0,27	0,13	0,16 ± 0,07
	4	1,09	1,06	1,10	1,08 ± 0,01	4,6	5,9	3,6	4,7 ± 0,80	0,18	0,11	0,20	0,16 ± 0,03
	15	1,72	1,48	1,72	1,64 ± 0,11	3,0	3,3	3,4	3,2 ± 0,15	0,10	0,15	0,11	0,12 ± 0,02
8	1	1,00	1,10	1,00	1,03 ± 0,04	6,2	5,2	4,5	5,3 ± 0,60	0,09	0,20	0,19	0,16 ± 0,05
	4	0,69	1,10	1,00	0,93 ± 0,16	4,2	4,6	4,5	4,4 ± 0,15	0,24	0,17	0,12	0,18 ± 0,04
	15	1,11	1,60	1,00	1,24 ± 0,24	4,4	4,3	4,3	4,3 ± 0,04	0,20	0,31	0,16	0,22 ± 0,06
9	1	0,97	0,77	1,29	1,01 ± 0,19	6,8	5,7	5,4	6,0 ± 0,55	0,12	0,18	0,21	0,17 ± 0,03
	4	1,14	0,68	1,12	0,98 ± 0,20	5,2	5,3	5,0	5,2 ± 0,11	0,37	0,11	0,11	0,20 ± 0,11
	15	0,74	1,34	0,71	0,93 ± 0,27	5,1	5,1	5,0	5,1 ± 0,04	0,16	0,40	0,28	0,28 ± 0,08

Mise en évidence de quelques activités biologiques des bactéries nodulaires du pois chiche: réduction d'azote, solubilisation du phosphate et antagonisme anti-pathogénie**Nature du diplôme :** Master**Domaine :** Science de la Nature et de la Vie**Filière :** Ecologie et environnement**Spécialité :** Ecologie Microbienne

Ayant comme objectif la mise en évidence de l'intérêt des bactéries nodulaires du pois chiche, sur la plante hôte et sur son environnement, cette étude s'est focalisée sur 16 bactéries nodulaires diversifiées en genre et en espèces en testant leur pouvoir sur trois types d'activité biologique. Le pouvoir de transformer l'azote est vérifié via deux tests, mettant en évidence la présence du nitrate réductase et de la nitrogénase. Le pouvoir de solubilisation du phosphate naturel (phosphate tricalcique) est cherché qualitativement sur trois milieux solides différents et quantitativement sur le milieu liquide NBRIP. L'activité antimicrobienne des bactéries nodulaires est testée contre six bactéries pathogènes par la méthode de disque et contre deux champignons phyto pathogènes par confrontation directe sur milieu gélosé. La plupart des bactéries nodulaires testées ont montré leur capacité de réduire et de fixer l'azote. Six bactéries ont révélé leur pouvoir de solubiliser le phosphate naturel. Trois de ces dernières sélectionnés via leur indice de solubilisation, ont subi un test qualitatif. Le résultat montre que la plus grande quantité du phosphate naturel est libérée pendant le deuxième jour d'incubation pour les trois bactéries testées. Cette solubilisation est accompagnée d'une chute de pH dans le cas de deux bactéries et une stabilité de ce dernier dans le cas de la souche *M.ciceri* qui a enregistré la plus grande quantité de phosphate solubilisé. La plus importante activité antibactérienne et antifongique est montrée par le genre nodulaire *Burkholderia* contre le plus grand nombre de bactéries pathogènes, et contre les deux champignons phytopathogènes utilisés. Avec ces qualités détectées dans cette étude, ces bactéries nodulaires pourraient être efficaces dans le bio contrôle de divers agents microbiens phytopathogènes ainsi que dans la biofertilisation du sol.

Mots clés : Pois chiche, antagonisme, fixation d'azote, solubilisation.**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire, faculté SNV, UFM Constantine1.**Jury d'évaluation :****Président du jury :** Mlle ARABET Dallel (M.C.A- UFM Constantine).**Rapporteur :** Mr. BENHIZIA Yacine (Professeur - UFM Constantine).**Co-rapporteur :** Mlle. DEKKICHE Samia (M.C.B-UHL Batna).**Examineurs :** Mme. GUERGOURI Ibtissem (M.C.A-UFM Constantine)**Date de soutenance : 16/7/2019**