

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



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master 2

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Thème

Viabilité et efficacité des souches de *Pseudomonas* spp.
fluorescents lyophilisées et conservées à 4°C

Présenté par :

Arouri Imène

Zitouni Imane

Devant le jury composé de :

M ^{me} AMMAD. F	M.C.A	USDB 1	Président
M ^{me} BENOUSSAID.N	M.C.B	USDB 1	Promotrice
M ^{me} TOUA. D	M.A.A	USDB 1	Examinatrice

Année universitaire : 2021/2022



Remercîment

Avant tout, nous remercions notre Dieu tout Puissant, de nous avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce modeste travail.

Ces quelques lignes vont nous permettre de remercier les responsables et les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail soit au niveau scientifique mais aussi personnel, et sans qui, notre travail n'aurait pu aboutir.

Nous voudrions remercier plus particulièrement notre promotrice **Dr BENOUSSAID Nacera** maitre de conférences B à l'université de BLIDA-1- qui a accepté de nous encadrer et de diriger ce travail de recherche. Nous la remercions pour son soutien, ses conseils, sa simplicité, sa générosité scientifique et sa qualité humaine.

Nous sommes très honorées par la présence de **Dr AMMAD Faiza** maitre de conférences B à l'université de BLIDA-1- pour avoir accepté de présider le jury de la soutenance de notre mémoire qu'elle trouve ici nos vifs remerciements.

Nous sommes très honorées par la présence de l'examinatrice **Mme TOUA Dalila** maitre de conférences A à l'université de BLIDA-1- pour avoir accepté d'évaluer notre travail.

Nos remerciements sont aussi adressés au professeur **BECHAABANE Messaoud** pour sa générosité scientifique et ses conseils.

On aimerait exprimer nos plus sincères remerciements à **Mme IHSSANE** ingénieur de laboratoire PFE à l'université de BLIDA-1-, pour son accueil et sa disponibilité.

Nous voudrions remercier plus particulièrement **M^{me} ZITOUNI Samia** pour sa disponibilité, pour ses nombreuses orientations, pour ses conseils avisés et surtout pour son aide précieuse dans la partie pratique de ce travail.

Notre remerciement également à **Mme FADIL Djamila**, ingénieur de laboratoire de Mycologie, ainsi que **Mme Hayat, Mme Nadjia et Mr Walid** pour leur accueil, leur aide et leur accompagnement durant toute la durée de travail de laboratoire

Enfin nous adressons nos sincères remerciements à tous les enseignants du département de biotechnologie qui ont contribué à notre formation.

Un grand merci à nos collègues de promotion Biotechnologie microbienne, ainsi qu'à toute personne qui a aidé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude

À mes très chères mères, (Malika, Nassima, Samira) quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point vous remercier comme il se doit. Votre affection me couvre, votre bienveillance me guide et votre présence à mes côtés a toujours été mes sources de force pour affronter les différences obstacle.

À l'âme de mon Grand Père رحمه الله

À ma Princesse Sabrina, mon unique sœur mon cœur, ma vie et mon bonheur.

À mes frères, Smail, Nour Eddine et Djaafar qui sont toujours à côtés de moi et me soutenir et me donner la force pour terminer mes études.

À la plus belle femme qui j'ai rencontré Dr Yakhou Houria pour tous les encouragements.

À ma jolie binôme Imane

À mes amis Chaïma, Safia et Hayet

À mes collègues de la promo de Biotechnologie Microbienne

À tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'accomplissement de ce travail.

Parfois, les mots ne suffisent pas pour exprimer tout le bien qu'on ressent !

Juste ... MERCI à vous

Dédicace

Je dédie cet humble travail

À mes chers parents,

Pour leurs sacrifices et leurs encouragements ;

Pour leur soutien tout au long de mes études

Aucun mot, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect,

Ma considération et l'amour éternel

Et mon bien être dans les meilleures conditions,

***Je remercie DIEU de l'avoir protégé, et je prie pour que DIEU les garde pour
moi***

Trouvez en ce travail le fruit de votre dévouement et l'expression de

Ma gratitude et mon profond amour.

À toute la famille ZITOUNI et KESRI.

À mon cher binôme et ma sœur Imène.

À Tous ceux qui m'ont aidé et soutenu.

Résumé

Titre : Viabilité et efficacité des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisées et conservées à 4 c°

Notre travail a pour but d'étudier l'impact des effets de la lyophilisation sur la viabilité et l'efficacité de quatre souches de *Pseudomonas* spp fluorescent, ayant un potentiel phytobénéfique. En premier lieu, les test de viabilité sont réalisés avec des souches lyophilisées (F21, BB10, BB9 et PI9) et conservées pendant dix années à 4°C. Après dénombrement, selon la méthode directe sur le milieu solide KB en boîte de Pétrie, le taux de survie varie entre 4.52 % à 68.75%. Ces résultats montrent, particulièrement que la viabilité des souches BB10 et PI9 a légèrement diminué.

En seconde partie, les tests portant sur la stabilité des quatre souches bactériennes, en état de lyophilisation, en comparaison avec l'état frais (non lyophilisation) ont montré que leur pouvoir de synthèse des métabolites secondaires étudiés est toujours actif. Les métabolites ciblés sont en relation avec les effets phytobénéfiques : l'Acide Indole Acétique, Cyanure d'hydrogène, Phénazines, protéases, amylase et phosphatases. De même, les tests des activités antagonistes *in vitro*, réalisés par confrontation directe sur milieux solides (KB, PDA et Mixte), indiquent clairement que les quatre souches sont toujours antagonistes vis-à-vis des trois agents fongiques phytopathogènes : *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f sp *lini* et *Fusarium oxysporum* f sp *albedinis*. Le meilleur taux d'inhibition (72.5%) a été réalisé avec la souche F21 sur le milieu KB.

Mots clés : *Pseudomonas* spp fluorescent, *Fusarium oxysporum*, lyophilisation, conservation, viabilité, antagonisme.

Abstract :

Title : Viability and efficacy of freeze-dried fluorescent *Pseudomonas* spp strains stored at 4°C

Our work aims to determine the impact of freeze-drying on the viability, efficiency and antagonistic activity of fluorescent *Pseudomonas* spp. The first part of our work concerns the study of the viability of four strains of freeze-dried fluorescent *Pseudomonas* spp (F21, BB10, BB9 and PI9) after 10 years of storage at 4°C by the direct enumeration method on a Petrie dish. . The survival rate varies between 4.52% and 68.75%. The counting results show that the BB10 rt PI9 strains decreased their viability after this drying time. The second part focuses on the study of the effectiveness of four strains of fluorescent *Pseudomonas* spp (F21, BB10, BB9 and PI9), freeze-dried in comparison with non-freeze-dried strains by testing the production capacity of some secondary metabolites. The four strains tested have kept their ability to produce different types of secondary metabolites such as Indole Acetic Acid, Hydrogen Cyanide, Phenazine and some enzymes such as protease, amylase, phosphatase....

The study of the effectiveness of the four strains of fluorescent *Pseudomonas* spp in the inhibition of the pathogenic agent was carried out by the method of direct confrontation vis-à-vis three fungal strains of *Fusarium oxysporum* (*Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f sp *lini* and *Fusarium oxysporum* f sp *albedinis*). This method made it possible to highlight antagonistic potentialities in vitro, variable against the three fungal strains on the three culture media examined (King B, Potato Dextrose Agar and Mixed). The best result was obtained by strain F21 against G7 with an inhibition rate of 72.5% on King B medium.

Keywords: Biological activity, antagonist activity, fluorescent *Pseudomonas* spp, *Fusarium oxysporum*, freeze-drying.

ملخص

العنوان: جدوى وفعالية سلالات *Pseudomonas spp* الفلورية المجففة بالتجميد المخزنة عند 4 درجات مئوية

يهدف عملنا إلى دراسة تأثير تأثيرات التجفيف بالتجميد على صلاحية وكفاءة أربع سلالات من الفلورية ، مع إمكانات نباتية. أولاً ، يتم إجراء اختبارات الصلاحية باستخدام *Pseudomonas spp* وتخزينها لمدة عشر سنوات عند 4 درجات (PI9 و BB9 و BB10 و F21) سلالات مجففة بالتجميد صلب في طبق بتري ، يتراوح معدل البقاء KB مئوية. بعد العد ، باستخدام الطريقة المباشرة على وسط على قيد الحياة بين 4.52% و 68.75%. تظهر هذه النتائج ، على وجه الخصوص ، أن صلاحية سلالات قد انخفضت بشكل طفيف PI9 و BB10

في الجزء الثاني ، أظهرت الاختبارات المتعلقة باستقرار السلالات البكتيرية الأربعة ، في حالة التجميد والتجفيف ، مقارنة بالحالة الطازجة (غير المجففة بالتجميد) أن قدرتها على تخليق المستقلبات الثانوية المدروسة لا تزال نشطة . ترتبط المستقلبات المستهدفة بالتأثيرات المفيدة النباتية: حمض الإندول ، سيانيد الهيدروجين ، الفينازينات ، البروتياز ، الأميليز والفوسفاتاز. وبالمثل ، فإن اختبارات الأنشطة العدائية في (Mixed و PDA ، KB) المختبر ، التي أجريت عن طريق المواجهة المباشرة على الوسائط الصلبة تشير بوضوح إلى أن السلالات الأربعة معادية دائماً فيما يتعلق بالعوامل الفطرية المسببة للأمراض النباتية و *Fusarium oxysporum f sp lycopersici* ، *fusarium oxysporum f sp lini* ، الثلاثة: F21 تم تحقيق أفضل معدل تثبيط (72.5%) مع سلالة *fusarium oxysporum f sp albedinis*. KB على وسط

Pseudomonas spp ، *Fusarium oxysporum* الكلمات المفتاحية: النشاط البيولوجي ، النشاط المضاد ، الفلوريسنت ، التجفيف بالتجميد *oxysporum* .

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribose Nucléotidique

AIA : Acide Indole Acétique

ARN : Acide Ribosomique Nucléotidique

F : Fusarium

Fig : Figure

Foa : *Fusarium oxysporum* f sp *albedinis*

Fol : *Fusarium oxysporum* f sp *lipersici*

Foln : *Fusarium oxysporum* f sp *lini*

F.Sp : Forme Spécial

H₂O₂ : Eau Oxygénée

HCN : Cyanure D'hydrogène

KB : King B

LY : Lyophilisée

Min : Minute

Mm : Millimètre

Mol : Mole

NH₃ : Ammoniac

NL : Non lyophilisée

NO⁻³ : Nitrate

P : *Pseudomonas*

PDA : Potato Dextrose Agar

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

PH : Potentiel Hydrogène

UFC : Unité Formant Colonies

UV : Ultraviolet

µm : Micromètre

TABLE DES MATIERES

Remercîment	
Dédicace	
Résumé	
Liste des abréviation	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Chapitre I : synthèse bibliographique	
I. PGPR	
I.1. Generalities	3
I.2. Modes d'action	5
▪ Mécanismes directs	5
▪ Mécanismes Indirects	6
II. Les <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents bénéfiques	
II.1. Historique.....	7
II.2. Taxonomie	8
II.3. Caractéristiques généraux	10
II.4. Ecologie.....	11
II.5. Facteurs affectant la colonisation et la persistance des hôtes.....	13
II.5.1. Antibiotiques et métabolites secondaires.....	13
II.5.2. Sidérophores et Pigments.....	14
II.6. Applications.....	15
II.6.1. Environnementale.....	15
II.6.2. Biodégradation.....	15
II.6.3. Médecine.....	15
III. La Bioformulation.....	16

IV. La Lyophilisation	18
IV.1. Impact du séchage sur la viabilité des bactéries.....	19
IV.1.1. Modification de la structure membranaire.....	20
IV.1.2. Dommages de l'ADN.....	20
IV.1.3. Dommages des protéines.....	20
IV.2. La Cryoprotection.....	21
Chapitre II : Matériels et méthodes	
I. Matériel.....	22
I.1 Matériels non biologiques.....	22
I.2. Matériels biologiques.....	22
I .2.1. Souches bactériennes.....	22
I.2.2. Souches fongiques	23
II. Méthodes.....	23
II.1. Purification des souches bactériennes lyophilisées.....	23
II.2. Vérification de l'identité des souches	
II.2.1 Coloration de Gram.....	24
II.2.2. Test oxydase	25
II.2.3. Test catalase	25
II.2.4. La fluorescence.....	25
II.3. Viabilité des souches	25
II.2.1. Les souches lyophilisées	25
II.4. Vérification de l'efficacité des souches	26
II.4.1. Production de quelques métabolites secondaires.....	26
II.4.1.1. Synthèse de l'acide indole acétique.....	26
II.4.1.2. Production de cyanide d'hydrogène HCN	26
II.4.1.3. Production de phénazines	26

II.4.2. Activité enzymatique.....	27
II.4.2.1. Phosphatase	27
II.4.2.2. Protéase	27
II.4.2.3. Amylase	27
II.4.2.4. Production d'ammoniac.....	28
II.4.2.5. Production de cellulase.....	28
II.5. Activité antagoniste <i>in vitro</i>	29
II.5.1. Purification des souches fongiques.....	29
II.5.2. Purification de la bactérie phytopathogènes.....	29
II.5.3. Principe du pouvoir antagoniste.....	29
II.5.3.1. Vis-à-vis des souches fongiques.....	29
II.5.3.2. Vis-à-vis de la bactérie.....	30

Chapitre : Résultats de discussions

I. I. Caractérisation des souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents.....	32
II. Viabilité des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents lyophilisées et conservation à 4°C pendant 10 ans	35
III. Etude d'efficacité des souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents.....	36
III.1. Production de quelques métabolites secondaires.....	36
➤ Synthèse de l'acide indole acétique (AIA).....	37
➤ Production de cyanure d'hydrogène.....	39
➤ Production de phénazines.....	39
III.2. Production de quelques enzymes.....	40
➤ Phosphatase	41
➤ Protéase.....	42
➤ Amylase	43
➤ Production d'ammoniac.....	43
➤ Cellulase.....	44

IV. Résultats de test d'activité antagoniste *in vitro*45

➤ **Sur milieu PDA45**

➤ **Sur milieu KB.....48**

➤ **Sur Milieu Mixte.....51**

IIV. Activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp fluorescent

lyophilisées et non lyophilisées vis-à-vis bactérie phytopathogènes

EHH3.....55

Conclusion5

Références bibliographique

Annexe

Liste des figures

Figures	Titre	Page
Figure 01	Le mode d'action possible utilisé par les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) vers la promotion de la croissance des plantes	7
Figure 02	Interaction plant-microorganisme qui se produisent dans la rhizosphère	12
Figure 03	Purification des souches de <i>Pseudomonas.spp</i> fluorescents lyophilisées après plusieurs repiquages.	24
Figure 04	Schéma de la méthode de confrontation directe champignon-bactérie	30
Figure 05	Schéma de la méthode de disque d'interaction bactérie-bactéries	31
Figure 06	La fluorescence des souches de <i>Pseudomonas fluorescent</i> sous lumière UV	33
Figure 07	Observation microscopique de coloration de Gram (×100)	33
Figure 08	Résultat du test KOH des souches étudiées	34
Figure 09	Effervescence des souches de <i>Pseudomonas spp.fluorescent</i>	34
Figure 10	Evolution des concentrations des quatre souches de <i>Pseudomonas spp. fluorescent</i> avant, et après 3 ans , 5ans et 10 ans de la conservation à 4°C.	36
Figure 11	Production d'autres types d'AIA par quelques souches <i>Pseudomonas spp</i> fluorescents lyophilisées	38
Figure 12	Production d'autres types d'AIA par quelques souches <i>Pseudomonas spp</i> fluorescents non lyophilisées	38
Figure 13	Production d'HCN par les souches de <i>Pseudomonas spp</i> fluorescents	39
Figure 14	Production de phosphatase par les souches de <i>Pseudomonas spp</i> fluorescent lyophilisé et non lyophilisé	41

Figure 15	Production des enzymes protéolytique par <i>pseudomonas</i> spp fluorescents	42
Figure 16	Résultat de la production amylolytique chez les souches de <i>pseudomonas</i> spp fluorescent	43
Figure 17	Production d’NH ₃ par toutes les souches de <i>Pseudomonas</i> spp. Fluorescent	43
Figure 18	Production de cellulase par des souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents	44
Figure 19	Le taux d’activité antagoniste des quatre souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescent lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de <i>Fusarium</i> sur milieu PDA.	45
Figure 20	Le taux d’activité antagoniste des quatre souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescent non lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de <i>Fusarium</i> sur milieu PDA	46
Figure 21	Activité antagoniste de la souche BB10 ET BB9 lyophilisées vis-à-vis Foa sur milieu PDA	46
Figure 22	Activité antagoniste de la souche BB9 lyophilisées vis-à-vis Fol sur milieu PDA	47
Figure 23	Activité antagoniste de la souche BB9 et F21 lyophilisées vis-à-vis Foln sur milieu PDA	47
Figure 24	Activité antagoniste de la souche BB10 et PI9 non lyophilisées vis-à-vis Foa sur milieu PDA	47
Figure 25	Le taux d’activité antagoniste des quatre souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescent lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de <i>Fusarium</i> sur milieu KB.	48
Figure 26	Le taux d’activité antagoniste des quatre souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescent non lyophilisées fluorescent vis-à-vis les trois formes spéciales de <i>Fusarium</i> sur milieu KB	49
Figure 27	Activité antagoniste de la souche BB9 et PI9 lyophilisées vis-à-vis Foa sur milieu KB	49
Figure 28	Activité antagoniste de la souche BB10 et PI9 lyophilisées vis-à-vis Fol sur milieu KB	50

Figure 29	Activité antagoniste de la souche BB10 et PI9 lyophilisées vis-à-vis Foln sur milieu KB	50
Figure 30	Activité antagoniste de la souche BB9 et F21 non lyophilisées vis-à-vis Foa sur milieu KB	50
Figure 31	Activité antagoniste de la souche F21 non lyophilisées vis-à-vis Foln sur milieu KB	51
Figure 32	Activité antagoniste de la souche BB10 et PI9 non lyophilisées vis-à-vis Fol sur milieu KB	51
Figure 33	Le taux d'activité antagoniste des quatre souches <i>Pseudomonas</i> spp fluorescent lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de <i>Fusarium</i> sur milieu mixte.	51
Figure 34	Le taux d'activité antagoniste des quatre souches <i>Pseudomonas</i> spp fluorescent non lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de <i>Fusarium</i> sur milieu mixte.	52
Figure 35	Activité antagoniste de la souche BB10 et F21 lyophilisées vis-à-vis FOA sur milieu mixte	53
Figure 36	Activité antagoniste de la souche F21 lyophilisées vis-à-vis Fol sur milieu mixte	53
Figure 37	Activité antagoniste de la souche BB9 non lyophilisées vis-à-vis Foa sur milieu mixte	53
Figure 38	Activité antagoniste de la souche F21 non lyophilisées vis-à-vis Fol sur milieu mixte	54

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Page
Tableau 1	Origine des souches bactériennes lyophilisées	22
Tableau 2	Caractérisation physiologique et biochimique des souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescent.	32
Tableau 3	Le taux de viabilité des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescent avant et après la conservation 4°C	35
Tableau 4	Principaux métabolites secondaires produits par <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents lyophilisée et non lyophilisées.	36
Tableau 5	Résultats de la production de quelques métabolites secondaire chez les souches lyophilisés et non lyophilisés de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents	37
Tableau 6	Résultats de la production de quelques enzymes chez les souches <i>Pseudomonas</i> spp fluorescent lyophilisé et non lyophilisées	39
Tableau 7	L'activité antagoniste des souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescent lyophilisées et non lyophilisées vis-à-vis bactérie phytopathogènes EHH3	55

Introduction

L'agriculture moderne est confrontée à plusieurs défis, notamment la sécheresse, le stress thermique, la salinité du sol, l'épuisement des nutriments minéraux et la pression évolutive des ravageurs et des agents pathogènes qui ont affecté la productivité mondiale au niveau économique (**Tilman et al., 2011 ; Timmusk et al., 2017**).

La population microbienne associée à l'écosystème du sol est très diversifiée tant dans ses performances métaboliques que dans ses aspects fonctionnels et agit comme une source principale d'inoculum pour la rhizosphère (**Crecchio et al., 2018**).

Parmi les organismes supérieurs du sol, les plantes bénéficient des effets directs et/ou indirects des microorganismes en particulier ceux de la flore rhizosphérique. Une flore bactérienne rhizosphérique hétérogène influence favorablement la croissance des plantes, et également connue sous l'acronyme PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria, ou rhizobactéries stimulatrice de la croissance des plantes (**Munees et Mulugeta, 2014**).

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR), sont un groupe diversifié de bactéries du sol, des composants clés des systèmes sol-plantes, où elles sont engagées dans un réseau intense d'interactions dans la rhizosphère, affectant ainsi la croissance et le rendement des plantes. Elles sont considérées comme un outil important et prometteur pour une agriculture durable. Les PGPR favorisent directement ou indirectement la croissance et le développement des plantes, soit en libérant des régulateurs de croissance des plantes phytohormones ou d'autres substances biologiquement actives. Ils comprennent plusieurs genres : *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum* et les *Pseudomonas* (**Mor, et al.2014**).

Parmi les rhizobactéries, le groupe des *Pseudomonas* fluorescents est l'un des pôles microbiens ayant démontré des potentialités phytobénéfiques certaines (**Lemanceau ,1992 ; Vacheron, 2015; Novo et al., 2017**). Les *Pseudomonas* spp. fluorescents présentent un intérêt scientifique majeur, ils se caractérisent par une diversité génétique et phénotypique en relation avec leur impact positif sur le fonctionnement de la rhizosphère, en exerçant des actions directes et/ou indirectes sur le développement de la plante. Ce groupe rhizobactérien se caractérise par des avantages écologiques, leur permettant d'évoluer dans les rhizosphères de diverses plantes, en établissant des relations interactives. En plus, ces rhizobactéries sont caractérisées par un arsenal métabolique, s'exprimant par la synthèse de divers métabolites secondaires impliqués

dans les aspects trophiques, nutritionnels et de compétition avec les autres microorganismes (Loper et al, 2011 ; Figueroa-Lopez et al., 2016) .

Pour assurer une meilleure conservation, compatibilité avec la préservation d'une viabilité maximale, et rendre ainsi le stockage, le transport et la commercialisation des microorganismes plus économique, le séchage des microorganismes est imposé (Mputu et al., 2014).

La formulation des bactéries en général et des *Pseudomonas* spp en particulier (Mputu et al., 2014) a pour ce but (Demirhan et al., 2010). Il existe plusieurs techniques de déshydratation des micro-organismes appliquées en applications pratiques, à savoir l'atomisation (Coulibaly et al., 2011), la fluidisation (Li et al., 2004) et la lyophilisation (Palmfeldt et al., 2003 ; Coulibaly et al., 2009). Ces méthodes sont assez agressives vis-à-vis des micro-organismes puisqu'elles soumettent ces derniers à des variations plus ou moins importantes de température et ou de pression.

Par ailleurs, des effets liés au flux d'eau à travers les membranes cellulaires peuvent également être déterminants sur la qualité du produit séché (Coulibaly et al., 2011). La littérature indique que de toutes ces techniques, la lyophilisation apparait la plus utilisée en dépit de son cout, pour la déshydratation et la conservation des bactéries en général et des *Pseudomonas* spp en particulier, car elle est adaptée pour les souches sensibles à des températures élevées (Palmfeldt et al., 2003).

L'objectif de notre travail est de vérifier la viabilité et l'efficacité de quatre souche de *Pseudomonas* lyophilisées et conservées pendant 10 ans à 4 C° par des tests d'antagonisme *in vitro* et de tester leur stabilité par rapport à la synthèse de quelques métabolites secondaires impliquées dans les effets de phytoprotection et de phytostimulation.

I. PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)

I.1. Généralités

Un grand nombre de microorganismes vivent dans le sol. On compte les virus, les bactéries, les champignons, les protozoaires et les algues (**Paul et Clark, 1996**). Les bactéries sont les organismes les plus nombreux et représentent en moyenne $6 \cdot 10^8$ cellules par gramme de sol et un poids de 10000 kg/ha équivalant à 5% du poids sec des composés organiques du sol. On définit alors les bactéries associées aux racines des plantes comme les rhizobactéries. Celles-ci sont généralement des souches très compétitives capables de coloniser le système racinaire riche en éléments nutritifs, tout au long du cycle de développement de la plante (**Kloepper, 1993**). Si la plante libère des composés organiques, à l'inverse elle prélève de l'eau et des éléments minéraux indispensables à son métabolisme. Les échanges entre la plante et le sol sont influencés par les rhizobactéries et ce d'autant plus que leur densité et leur activité sont élevées.

Les rhizobactéries sont des hétérotrophes typiques, elles nécessitent donc des composés organiques comme source d'énergie. Leurs besoins sont entièrement comblés à l'intérieur même de la rhizosphère. Les rhizobactéries utilisent en effet de nombreux substrats provenant de la plante : les cellules corticales et épidermales des racines qui se détachent, les polysaccharides du mucilage racinaire, les sucres et les acides aminés et organiques des exsudats racinaires, etc. (**Campbell et Greaves, 1990**). L'abondance des bactéries dans le sol s'explique par leur multiplication rapide et leur capacité à utiliser une grande variété de substrats comme sources d'énergie et d'éléments nutritifs (**Glick, 1995**).

Les microorganismes rhizosphériques incluent les symbiotes (*Rhizobia*, actinobactéries et champignons mycorhiziens) et les saprophytes libres. Les microorganismes rhizosphériques en général, et les bactéries diazotrophiques en particulier, exercent sur les plantes divers effets. Par ailleurs, l'association des bactéries avec les racines a des influences importantes sur la santé de la plante, la productivité et la qualité du sol (**Konate, 2007**). La colonisation des racines par les bactéries est observée depuis longtemps, mais seulement dernièrement, son importance pour la croissance et le développement des plantes est devenu clair (**Glick, 1995**). La quantité et la composition des exsudats racinaires conditionnent également la nature des activités bactériennes.

Ces activités résultent de la synthèse de métabolites tels que les antibiotiques, sidérophores, substances de croissance, acide cyanhydrique, lipopolysaccharides (**Voisard et al., 1989; Van Peer et al., 1991**). Cette influence se manifeste par une modification de la croissance de la plante et de la fréquence des infections fongiques de la racine (**Kloepper, 1993**).

Ces rhizobactéries sont considérées comme des concurrents microbiens efficaces dans la zone racinaire. L'effet visible des associations plante-microbe sur la croissance de plantes peut être positif, neutre, ou négatif. Certaines bactéries inhibent la croissance alors que d'autres la stimulent. Ces dernières sont souvent mentionnées comme des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Rhizobacteria : PGPR) (**Kloepper et al., 1989; Zahir et al., 2004**).

Le terme PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) a été introduit pour la première fois à la fin des années 1970, lorsqu'il a été démontré, par Kloepper et Schroth, que des souches de *Pseudomonas fluorescents* ont amélioré le rendement des cultures de pommes de terre jusqu'à 500% par la production de sidérophores ; chélateurs de fer, privant les bactéries pathogènes indigènes de fer (**Garcia et al., 2003**). Ce sont des bactéries libres du sol, qui ont la capacité de coloniser les systèmes racinaires et de favoriser la croissance ainsi qu'améliorer la productivité, la durabilité et la rentabilité des plantes cultivées par un mécanisme direct et indirect (**Kloepper et Schroth, 1978**). Ces bactéries peuvent donc influencer l'acquisition des nutriments et aussi moduler les taux d'hormones et atténuer les impacts négatifs des facteurs biotiques et abiotiques (**Ahemad et Kibret, 2013 ; Ngumbi et Kloepper, 2016**).

De plus, les PGPR se trouvent dans des environnements hautement compétitifs. En conséquence, elles ont développé plusieurs moyens offensifs pour cette compétition intra et interspécifiques, comme : des substances antibiotiques, des enzymes bactériolytiques et des toxines de nature protéique communément connues sous le terme de bactériocines (**Beneduzi et al., 2012 ; Mezaache et al., 2016**).

Les PGPR ont plusieurs avantages pratiques : elles sont répandues sur les sept continents, ne sont pas limitées phylogénétiquement (au moins cinq phyla et 24 genres) (**Rubin et al., 2017**), ils sont classés en fonction de leurs activités fonctionnelles en :

- Biofertilisants : en augmentant la disponibilité des nutriments dans la rhizosphère.
- Phytostimulants : par la promotion de la croissance des plantes généralement par les phytohormones.
- Biopesticides : Ils ont une action spécifique vis-à-vis des ravageurs, ils ne sont pas toxiques et se dégradent plus rapidement dans l'environnement (Thakore, 2006).

I.2. Modes d'action

▪ Mécanismes directs

La production de molécules organiques menant à la libération des nutriments et des régulateurs de croissance et l'augmentation de leurs biodisponibilités dans la rhizosphère, en l'absence de pathogènes, traduit l'effet direct phytobénéfique des PGPR (Parray *et al.*, 2015).

La fixation biologique de l'azote par le biais de la nitrogénase réductase, fournissant des électrons à forte puissance réductrice à la nitrogénase qui les utilise pour réduire N₂ en NH₃, ce qui permet de concentrer sa disponibilité et son accessibilité aux racines (Kim et Rees, 1994).

D'après Ahemad et Khan (2011) et Parray (2015), les cyanobactéries (*Anabaena* spp. et *Nostoc* spp.), *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. et *Azoarcus* spp sont signalés parmi les bactéries libres, endophytes ou à symbioses associatives, au potentiel de fixation biologique d'azote le plus notable.

La production de certaines hormones : plusieurs PGPR ainsi que certaines espèces de rhizobactéries pathogènes, symbiotiques et libres ont été signalés comme pouvant moduler les niveaux d'hormones végétales par la production d'auxines (l'acide indole 3- acétique AIA, particulièrement), de gibbérellines et de cytokinines dans le sol rhizosphériques (Han *et al.*, 2005).

La solubilisation des phosphates, formes insolubles non assimilables par les plantes, sous l'action des acides organiques de faible poids moléculaire (Ahemad et Kibret, 2013) et de différentes phosphatases (Glick, 2012), synthétisés par certaines bactéries du sol appartenant aux genres : *Azotobacter* spp., *Bacillus* spp., *Beijerinckia* spp., *Burkholderia* spp., *Enterobacter* spp., *Erwinia* spp., *Flavobacterium* spp., *Microbacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. Et *Rhizobium* spp. (Bhattacharyya et Jha, 2012).

- Mécanismes Indirects

Les PGPR peuvent être utilisées comme agents de biocontrôle et de lutte biologique, conférant à la rhizosphère un front de défense contre l'attaque des racines par les micro-organismes pathogènes. Les principaux modes de biocontrôle attribués à ces rhizobactéries sont :

L'antibiose : interaction biologique dont l'un des aspects est l'antagonisme contre les phytopathogènes et la compétition pour les nutriments (**Parray et al., 2015**).

La production de métabolites à activité antimicrobienne tels que l'ammoniac (NH₃), les antibiotiques phénaziniques (ex : la pyocyanine), les sidérophores, le cyanure d'hydrogène (HCN), les enzymes hydrolytiques (chitinases, glucanases, protéases, et lipases, etc.) (**Beneduzi et al., 2012**).

La bioremédiation des sols pollués par les métaux lourds toxiques et les pesticides (les composés xénobiotiques), par l'immobilisation et la transformation des métaux les rendant inactifs pour tolérer leur absorption. Les cellules végétales sont étroitement associées aux cellules microbiennes qui se développent en biofilm sur la surface de la racine, générant des molécules de signaux et entraînant un phénomène nommé : « *Quorum Sensing* ». Cette capacité des microbes à sentir le milieu environnant joue un rôle impératif dans l'efficacité nutritive et peut contrebalancer les effets délétères des métaux lourds sur les plantes (**Daniels et al., 2004**).

Les genres de PGPR comprennent : *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Micrococcus*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Agrobacterium*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Azospirillum*, *Flavobacterium*, *Serratia*, *Rhizobium* et certains sont membres des *Enterobacteriaceae* (**Niranjan et al., 2005 ; Bhattacharyya et Jha, 2012**) (**Figure 1**).

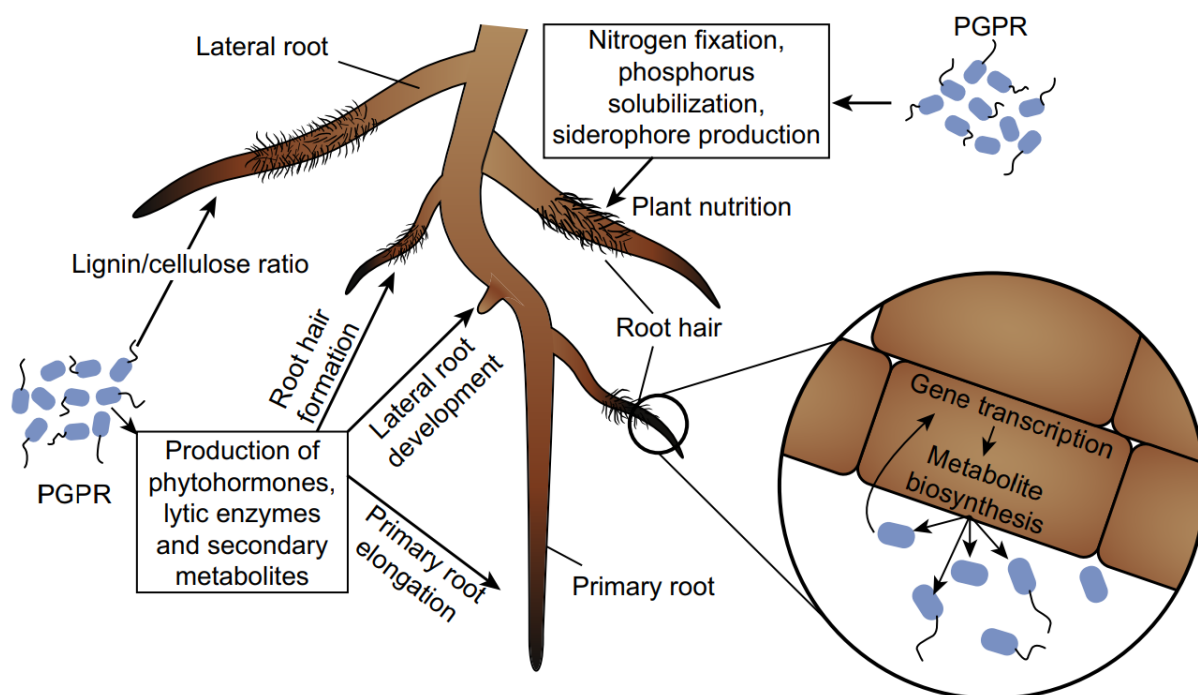


Figure 1 : Le mode d'action possible utilisé par les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) vers la promotion de la croissance des plantes (Vacheron et al.,2013).

II. Les *Pseudomonas* spp fluorescents bénéfiques

II.1. Historique

Le genre *Pseudomonas* est découvert en 1894 par Migula, c'est un groupe hétérogène vaste et complexe d'organismes appartenant au phylum des Proteobacteria, classe des Gammaproteobacteria, famille des Pseudomonaceae, ordre des Pseudomonales (Migula, 1894 ; Moore et al., 2006). Les *Pseudomonas* sont des bactéries ubiquistes, rencontrées souvent dans les sols, classées comme étant les meilleurs candidats PGPR (Saharan et Nohra ,2011).

Historiquement, toute bactérie bacille Gram négatif, strictement aérobie, non sporulant et mobile était classée comme appartenant au genre *Pseudomonas* (Anzai et al.,2000). Le nom *Pseudomonas* dérive des mots grecs pour "faux" (pseudos) et "unité unique" (monas). Il est donc ironique que la taxonomie au sein du genre *Pseudomonas* soit en cours de réorganisation à l'ère génomique (Palleroni, 2010).

II.2. Taxonomie

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe hétérogène complexe d'organismes appartenant à la famille des Pseudomonadaceae contenant 211 espèces valablement décrites mais dont 56 ont été reclassées dans d'autres genres. Ils font constamment l'objet d'une révision taxonomique continue en raison de l'amélioration des méthodologies d'identification des espèces. Les organismes précédemment classés dans le genre *Pseudomonas* sont désormais répartis entre les genres *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Acidovorax*, *Delftia*, *Hydrodenophaga*, *Brevundimonas*, *Stenotrophomonas* et *Xanthomonas*. De nombreuses souches identifiées n'ont pas d'espèce désignée (**Pitt et al., 2006 ; Hanery et al., 2011 ; Euzeby, 2014**).

Selon le « *Catalogue of Life* » la famille des Pseudomonadaceae est composée de dix genres, à savoir : *Azomonas*, *Azorhizophilus*, *Azotobacter*, *Cellvibrio*, *Chryseomonas*, *Mesophilobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobacter*, *Rugamonas*, *Serpens* (**Banki et al., 2021**). Douze espèces de *Pseudomonas* ont été trouvées dans des échantillons cliniques : *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. fluorescens*, *P. luteola*, *P. mendocina*, *P. monteilii*, *P. mosselii*, *P. oryzihabitans*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. putida*, *P. stutzeri* *P. veronii*. (**Banki et al., 2021**).

Le complexe d'espèces *P. fluorescens* contient environ 20 % d'espèces du genre *Pseudomonas* (**Mulet et al., 2010**). En janvier 2014, la liste des noms procaryotes avec statut dans la nomenclature (LPSN) reconnaissait 211 espèces et 18 sous-espèces dans le genre *Pseudomonas* (<http://www.bacterio.net/pseudomonas.html>) (**Mulet et al., 2010**). Cela reflète une augmentation de 40 % des espèces de *Pseudomonas* nouvellement définies par rapport au nombre de 2006 (**Mulet et al., 2010**). Au cours des dernières décennies, les isolats classés comme *P. fluorescens* ont été renommés et réorganisés en profondeur, conformément au degré élevé de diversité génomique au sein de ce complexe d'espèces (**Peix et al., 2009**).

Les méthodes moléculaires, y compris l'analyse des séquences de gènes d'ARNr 16S, d'autres gènes « domestiques » hautement conservés et, plus récemment, des génomes complets, ont accéléré le rythme de la réorganisation taxonomique, en particulier au sein du complexe d'espèces *P. fluorescens* (**Yamamoto et al., 2000 ; Palleroni, 2008**). La combinaison de ces trois gènes domestiques et du gène de l'ARNr 16S a été utilisée pour identifier les membres du genre *Pseudomonas*, créer un arbre phylogénétique et les diviser en différents groupes (**Anzai et al., 2000 ; Mulet et al., 2010**). La plus large gamme de diversité génomique dans le genre *Pseudomonas* se trouve chez *P. fluorescens* (**Mulet et al., 2010**).

Le complexe d'espèces *P. fluorescens* comprend au moins 52 espèces nommées séparément, dont *P. poae*, *P. synxatha*, *P. tolaasii*, *P. brassicacearum*, *P. chlororaphis* et *P. fluorescens* (**Konstantinidis et al., 2006 ; Silby et al., 2009 ; Almeida et Araujo 2013**). Le complexe d'espèces *P. fluorescens* peut également être divisé en trois clades taxonomiques plus petits, sur la base des analyses du gène ARNr 16S et du MLST (**van Passel et al., 2006 ; Goris et al., 2007 ; Silby et al., 2009 ; Mulet et al., 2010 ; Loper et al., 2012**).

Une approche pour étudier le niveau de diversité génétique entre les souches de *P. fluorescens* passe par la taille du pan-génome, qui est le nombre total de gènes trouvés dans toutes les souches. Alors que le pan-génome de *P. aeruginosa* est de 7 824 gènes, le pan-génome de la bactérie *P. fluorescens* est beaucoup plus grand, avec 13 782 gènes (**Silby et al., 2009**).

Ces deux études de génomes complets ont confirmé la grande diversité génétique au sein de ce groupe de bactéries. L'analyse de **Loper et al. (2012)** ont inclus une analyse BLASTp à plusieurs voies pour comparer les sept génomes complexes d'espèces de *P. fluorescens* nouvellement séquencés à des génomes précédemment annotés et séquencés.

La désignation de clade offre également des informations potentielles sur les différences fonctionnelles entre les grappes de *P. fluorescens*, y compris la présence/absence et le type de système de sécrétion de type III (T3SS), un complexe moléculaire « d'aiguille » utilisé par les bactéries pour injecter des protéines bactériennes dans les cellules hôtes (**Salmond et Reeves 1993 ; Loper et al., 2012**). Les gènes d'un T3SS se trouvent uniquement dans les clades 2 et 3, pas dans le clade 1. Le groupe de gènes de biosynthèse pour produire du cyanure d'hydrogène, une molécule volatile utilisée pour tuer les bactéries concurrentes, se trouve uniquement dans les clades 1 et 2 (**Ramette et al., 2003 ; Gross et Loper 2009 ; Loper et al., 2012**).

Les gènes trouvés dans chaque clade, tels que ceux du sidérophore pyoverdine (**Cornelis et al., 2009 ; Cornelis 2010**) reflètent des catégories fonctionnelles qui sont généralement préservées dans l'ensemble du genre *Pseudomonas* (**Loper et al., 2012**). L'analyse génomique comparative de *P. fluorescens* en est à ses débuts, mais comme il existe déjà des différences marquées dans la présence/l'absence de nombreux gènes entre les souches, cette approche est très prometteuse comme étape dans l'organisation du complexe d'espèces de *P. fluorescens* selon les putatifs différences fonctionnelles, taxonomie et génomique du genre *Pseudomonas* et du complexe d'espèces *P. fluorescens*.

II.3. Caractéristiques généraux

Le genre *Pseudomonas*, regroupe des bactéries en forme de bâtonnets, non sporulés, à Gram négatif, droits ou légèrement incurvés et mesurant 0,5 à 1,0 µm sur 1,5 à 5,0 µm (**Hanery et al.,2011**). Ils sont mobiles au moyen d'un ou plusieurs flagelles polaires qui jouent un rôle important dans la pathogénicité (**Kayser et al.,2001 ; Willcox 2007**). Ces bactéries peuvent produire des pigments, tels que la pyocyanine (vert-bleu) et la pyorubrine (jaune-vert) fluorescentes (**Palumbo ,1972 ; Enoch et al.,2004 ;Willcox 2007**). *P. fluorescens* mesurant 0,5 à 1 µm sur 2 à 7 µm, Elles apparaissent la plupart du temps bacilles libres ou en diplobacilles.

Les *Pseudomonas* ont un métabolisme respiratoire aérobie très strict avec de l'oxygène mais dans certains cas, le nitrate a été utilisé comme alternative permettant une croissance anaérobie. La plupart des espèces sont positives pour l'oxydase (sauf *P. luteola* et *P. oryzihabitans*) et positives pour la catalase. D'autres caractéristiques qui ont tendance à être associées aux espèces de *Pseudomonas* (à quelques exceptions près) comprennent la sécrétion de pyoverdine, un sidérophore jaune-vert fluorescent dans des conditions de limitation du fer (**Mayer et al.,2002**).

Les isolats de *P. fluorescens* dérivés d'échantillons non mammifères ont une plage de croissance permissive de 4 à 32 °C (**Moore et al.,2006**), tandis que les isolats d'humains et d'autres mammifères ont une plage supérieure élevée s'étendant jusqu'à 37 °C (**Chapalain et al.,2008 ; Donnarumma et al.,2010; Sperandio et al., 2012**), capables de fermenter le glucose, et chimioorganotrophes et se développent à un PH compris entre 4 et 8 (**Moore et al.,2006**).

Comme la plupart des membres du genre *Pseudomonas*, les souches du complexe d'espèces *P. fluorescens* se développent mieux dans un milieu riche contenant des peptides avec une source d'énergie de 0,1 à 1,0 % (wt/vol) (**Moore et al.,2006**). Des exemples de tels milieux de base comprennent le bouillon/gélose nutritif et le bouillon/gélose tryptique de soja (**Moore et al.,2006**). Les milieux sélectifs carencés en fer permettent de détecter la fluorescence naturelle produite par ces bactéries, qui est renforcée par une production accrue de sidérophores fluorescents. Les milieux A et B de King (**King et al., 1954**), le milieu de gélose Pseudosel (BBL Microbiology Systems) et le milieu de gélose *Pseudomonas* F (Difco Laboratories, Detroit, MI) sont tous des exemples de milieux améliorant les pigments.

Ces milieux contiennent également des composés supplémentaires, tels que le potassium, le magnésium et/ou le cétrimide, qui permettent en outre la croissance sélective des bactéries du complexe d'espèces *P. fluorescents*.

L'une des difficultés de l'isolement d'espèces particulières du genre *Pseudomonas* est qu'elles partagent un bon nombre des mêmes traits phénotypiques et poussent dans les mêmes conditions de culture. Cependant, il est possible d'utiliser la production de pigments, qui varie selon le groupe d'espèces, pour distinguer visiblement les isolats de différents groupes. Le pigment bleu-vert pyocyanine, facilement produit par les souches de *P. aeruginosa*, n'est généralement pas produit par les souches du complexe d'espèces *P. fluorescents* (Moore et al., 2006). Par conséquent, une culture mixte de bactéries du complexe d'espèces *P. fluorescents* et de bactéries *P. aeruginosa* cultivées sur de la gélose au cétrimide produira des colonies fluorescentes bleues de *P. aeruginosa* et des colonies fluorescentes non bleues de bactéries du complexe *P. fluorescents* elle produit un pigment fluorescent jaune-vert appelé pyoverdine, soluble dans l'eau et insoluble dans le chloroforme (Gao et al., 2012 ; Trögl et al., 2012).

II.4. Ecologie

Les *Pseudomonas* sont des bactéries ubiquitaires. Ils sont fréquemment présents dans l'eau, dans les sols et particulier dans la rhizosphère des plantes (Bossis et al., 2000) (figure2). Les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas* spp fluorescents sont parmi les plus abondantes dans la rhizosphère. Dans certains cas, elles représentent plus de 60% de la microflore bactérienne totale du sol. Différentes espèces de *Pseudomonas* spp fluorescentes ont été rapportés à la fois comme PGPR, et comme souches de biocontrôle des champignons phytopathogènes (Mezaache, 2012).

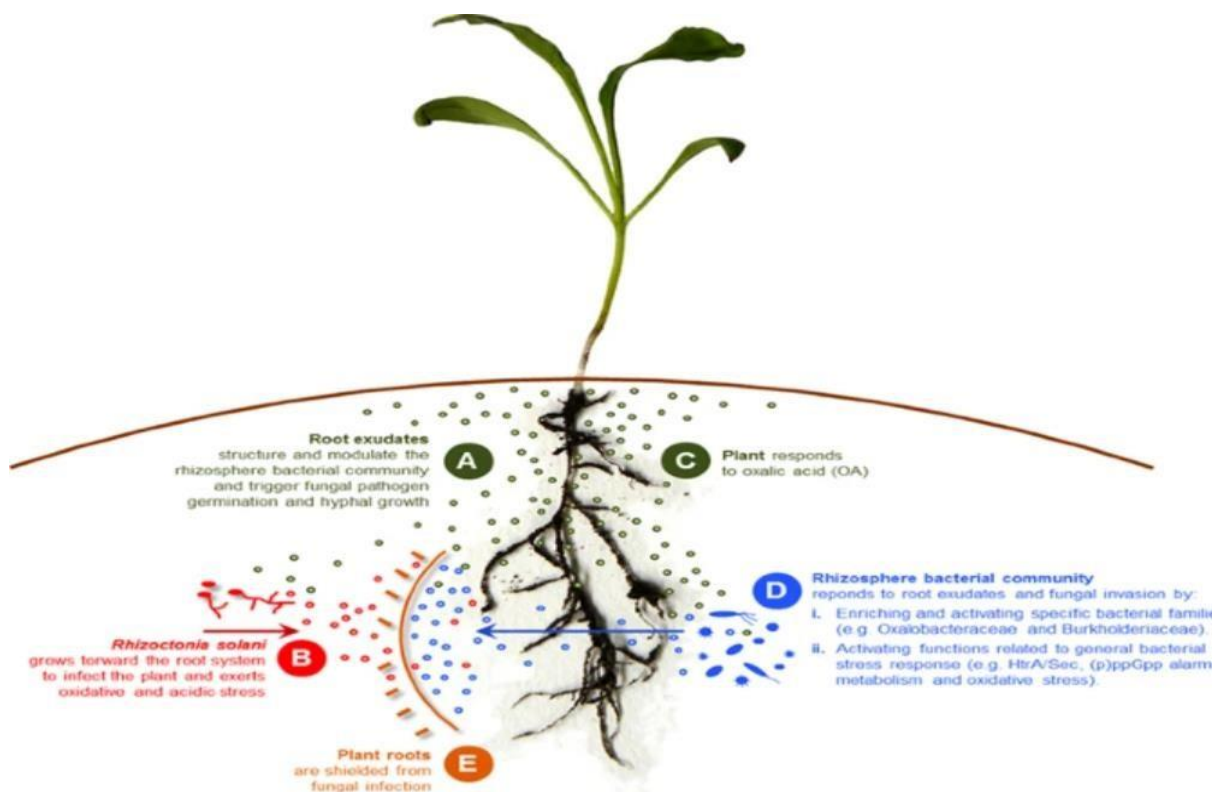


Figure 2 : Interaction plant-microorganisme qui se produisent dans la rhizosphère (Berendsen et al., 2012).

A : les exsudats racinaires structurant et modulant la rhizosphère

B : *Rhizoctonia solani* pousse vers le système racinaire pour infecter la plante et exerce un stress oxydatif et acide

C : la plante réagit à l'acide oxalique (OA)

D : communauté bactérienne de la rhizosphère répond aux exsudats racinaires et à l'invasion fongique

E : racines des plantes sont à l'abri des infections fongiques

Les *Pseudomonas* appartiennent au groupe de bactéries appelées PGRP (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Kloepper et schroth, 1978). Ce sont des bactéries capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et /ou en la protégeant contre des infections par des agents Phytopathogènes (weller, 1988).

Les cellules de *Pseudomonas* spp fluorescents se divisent en moyenne toutes les 5 h dans la rhizosphère de *Pinus radiata* et uniquement toutes les 77 h dans le sol non rhizosphériques (Bowen et Rovira, 1976). Cette différence conduit à un développement des *Pseudomonas* spp fluorescents significativement plus élevé dans la rhizosphère que dans le sol nu. Ces microorganismes sont donc considérés comme des rhizobactéries (Schroth et al., 1992).

Les *Pseudomonas* spp fluorescents ont été étudiés depuis des décennies pour leurs effets bénéfiques sur la stimulation de la croissance et la suppression efficace des maladies telluriques des plantes (Bakker et al., 2007). Ces rhizobactéries possèdent de nombreuses caractéristiques qui permettent leur utilisation dans la protection des cultures agricoles (Weller, 2007).

II.5. Facteurs affectant la colonisation et la persistance des hôtes

II.5.1. Métabolites secondaires

P. fluorescents produit une longue liste de métabolites secondaires qui lui permettent de rivaliser avec succès avec les micro-organismes concurrents. Les exemples incluent la phénazine (Laursen et Nielsen 2004 ; Mavrodi et al,2006), le cyanure d'hydrogène (HCN) (Ramette et al,2003). Les phénazines peuvent être produites par des bactéries Gram négatives présentes dans le sol et les environnements marins, avec *Pseudomonas* spp étant l'un des principaux producteurs (Mavrodi et al,2006).

Les phénazines sont des composés pigmentés qui ont des activités anti tumorales, antipaludiques, antiparasitaires et antimicrobiennes (Laursen et Nielsen. 2004). Le cyanure d'hydrogène est un composé volatil et incolore qui inhibe les oxydases du cytochrome c et d'autres métalloprotéines chez les bactéries concurrentes (Gross et Loper, 2009). La production de HCN par *P. fluorescents* habitant la rhizosphère supprime les maladies des plantes (Ramette et al,2003). Bien qu'il n'ait pas été étudié pour *P. fluorescents*, d'autres *Pseudomonas* spp sont capables de produire du HCN au cours d'une maladie humaine, comme la fibrose kystique (Enderby et al ,2009). Bien que les activités de ces métabolites secondaires sur les hôtes humains restent à déterminer, elles bénéficient à la survie de *P. fluorescents* dans des environnements polymicrobiens, ouvrant la possibilité d'un rôle pour ces métabolites dans la survie de *P. fluorescents* dans le microbiome humain.

II.5.2. Sidérophores et Pigments

La sécrétion d'un pigment fluorescent, la pyoverdine (anciennement appelée fluorescéine), est ce qui confère à *P. fluorescens* ses propriétés de fluorescence sous lumière UV. La pyoverdine est un sidérophore (**Hohnadel et Meyer, 1988**), un composé chélatant le fer de haute affinité qui est essentiel pour l'acquisition du fer de l'environnement, la croissance bactérienne et la survie (**Neilands, 1981**). Certaines souches de *P. fluorescens* contiennent des sidérophores secondaires supplémentaires pour l'acquisition du fer. *P. protegens* CHA0, une souche du complexe d'espèces *P. fluorescens*, produit le sidérophore secondaire énantiopyochéline (**Youard et al., 2007**), et la souche ATCC 17400 de *P. fluorescens* produit les sidérophores secondaires quinolobactine, pseudomonine, acinetobactine et anguibactine (**Mossialos et al 2000**). Les trois derniers sidérophores secondaires de cette souche sont synthétisés par une voie unique, différents substrats primaires déterminant quelle molécule de sidérophore finale est synthétisée (**Wuest et al 2009**).

Les souches BG33R (*P. synxantha*) et A506 (*P. fluorescens*) possèdent également les groupes de gènes nécessaires à la biosynthèse et à l'absorption d'une molécule de type pseudomine similaire à celle trouvée dans ATCC 17400, mais la fonctionnalité de cette molécule n'a pas encore été démontrée (**Mercado-Blanco et al., 2001 ; Loper et al., 2012**). L'ensemble complet de gènes nécessaires à la biosynthèse et à l'efflux d'un hémophore, qui permet la chélation et le transport de l'hème à travers une membrane externe spécifique (**Loper et al., 2012**), est également présent dans plusieurs souches de *P. fluorescens*, mais on ne sait pas comment et lorsque les hémophores sont utilisés par *P. fluorescens*. Beaucoup de travail reste à faire pour identifier le spectre des sidérophores produits par les souches de *P. fluorescens*, ainsi que pour déterminer leur rôle dans la physiologie de ces organismes dans différentes conditions, y compris la compétition polymicrobienne.

Comme beaucoup d'autres membres de son genre, *P. fluorescens* produit une gamme de pigments, avec et sans capacité sidérophore. En raison de la capacité de *P. fluorescens* à se développer à des températures aussi basses que 4°C, la contamination des produits alimentaires peut être un problème (**Gennari et Dragotto, 1992**). En 2010, les consommateurs européens ont remarqué que certains produits à base de mozzarella étaient bleus au lieu de blancs, et des niveaux extrêmement élevés de *P. fluorescens*, jusqu'à 106 UFC/g, ont été identifiés sur les échantillons de fromage « bleu » (**Andreani et al., 2014**). En plus d'être bleu, on sait peu de

choses sur ce pigment particulier produit par *P. fluorescens*. La pyocyanine, un autre pigment bleu, est produite par *P. aeruginosa*, mais ce métabolite secondaire n'a pas encore été identifié chez *P. fluorescens* (Lau et al, 2004). Cet incident indiquait soit l'émergence d'une nouvelle souche de *P. fluorescens* qui avait acquis la machinerie de biosynthèse d'un nouveau pigment bleu, soit l'acquisition horizontale de la machinerie de biosynthèse d'une autre souche de *Pseudomonas* étroitement apparentée.

II.6. Applications

II.6.1. Environnementale

Les bactéries appartenant à ces espèces présentent en effet un intérêt potentiel pour l'environnement. *Pseudomonas fluorescens* est utilisée en lutte biologique comme stimulateur de croissance des plantes PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*) (Ongena et al., 2005; Gao et al., 2012), elle est également utilisée comme catalyseur dans la réaction de transestérification de l'huile de *Jatropha* pour la production de biodiesel (Devanesan et al., 2007).

II.6.2. Biodégradation

De nombreuses souches de *Pseudomonas* jouent un rôle majeur dans les processus de biodégradation. *Pseudomonas fluorescens* a un rôle dans les processus de remédiation et traitement de sites pollués (sol, eau...) par la dégradation des hydrocarbures et d'autres types de polluants (Moneke et al., 2010). D'autres espèces sont capables de réduire les oxydes d'azote et de dégrader les composés xénobiotiques.

L'association champignon/bactérie est aussi très fréquente pour la dégradation de matières organiques, ou dans certains processus pathogènes (surinfection). *P. fluorescens* peut également être trouvé dans une relation antagoniste avec les microbes eucaryotes, y compris les oomycètes et les amibes (Howell et al., 1980 ; Schnider et al., 1995 ; Valverde et al., 2003 ; Rezzonico et al., 2005 ; Redondo-Nieto et al., 2012).

II.6.3. Médecine

Pseudomonas fluorescens produit un antibiotique particulier appelé mupirocine et qui a prouvé son efficacité dans le traitement de certaines maladies de la peau, des troubles oculaires et auditifs (Mazereeuw-Hautier, 2006).

III. La Bioformulation

La bio formulation est définie comme toute substance biologiquement active dérivée de la biomasse microbienne ou d'un produit contenant des microbes et leurs métabolites qui pourraient être utilisés dans la promotion de la croissance des plantes, l'acquisition de nutriments et le contrôle des maladies d'une manière respectueuse de l'environnement. Fondamentalement, la bio formulation est un mélange d'un ingrédient actif dans un produit formulé à base de substances inertes (inactives) (**Kaushik,2004 ; Glare et al.,2012**)

Les bioformulations à base de support inerte se sont avérées utiles pour incorporer les cellules microbiennes antagonistes dans la région rhizosphérique et système végétal pour une plus longue durée et pourrait être appliqué à la fois par voie foliaire et au sol. De plus, un autre avantage supplémentaire de ces bio formulations à base de support est la stabilité de l'adduit, y compris les antibiotiques, les sidérophores et les phytohormones, des métabolites volatils hydrolysant les enzymes en contact avec la plante (**Ardakani et al., 2010 ; Jorjani et al., 2011**).

Les espèces microbiennes les plus couramment utilisées dans les bioformulations microbiennes comprennent les genres bactériens *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* et les genres fongiques les plus couramment utilisés appartenant à *Trichoderma* spp. Il a été suggéré que divers PGPR et genres fongiques sécrètent des métabolites, y compris des activités antibiotiques et antifongiques. Certains des antibiotiques les plus courants sécrétés par les *Pseudomonas fluorescentes* comprennent la pyolutéorine, l'oomycine A, les phénazines et les diacétylphloroglucinols (**Haas et Defago, 2005**).

Les produits bioformulés offrent des alternatives vertes aux engrais chimiques et pesticides conventionnels utilisés pour la promotion et la suppression de la croissance des plantes des phytopathogènes, maintien de la fertilité du sol et suppression des maladies (**Arora et Mishra, 2016**). Ils visent à préserver les microbes, à valoriser leur potentiel, à délivrer leur mélange à la cible et à améliorer encore leurs activités (**Burges et Jones, 1998**).

Les dérivés bioformulés sont le besoin de l'agriculture d'aujourd'hui pour contrer l'effet des phytopathogènes et des zones agricoles sujettes aux maladies. Généralement, les espèces microbiennes utilisées pour les produits bioformulés contiennent des microbes rhizosphériques bénéfiques qui affectent la croissance et le développement des plantes directement ou indirectement dans leur environnement naturel (**Lugtenberg et Kamilova, 2009**).

La commercialisation de souches microbiennes, qu'il s'agisse de bactéries, de levures ou de moisissures, nécessite de les conditionner sous une forme durable stable (**Leslie et al., 1995**). Les méthodes de séchage seront passées en revue, surtout les méthodes appliquées à l'échelle industrielle, à savoir l'atomisation, la fluidisation et la lyophilisation. Elles sont assez agressives vis-à-vis des micro-organismes car elles impliquent de fortes variations de la température du produit (**Mille et al., 2005**). L'utilisation de cryoprotecteurs au cours de la lyophilisation et d'antioxydants pendant le stockage augmente significativement le taux de viabilité des cellules.

Le séchage est un procédé de conservation extrêmement ancien qui, privant l'aliment d'eau libre, interdit toute activité microbienne ou enzymatique. La concentration ne donne lieu qu'à une élimination d'eau partielle, mais elle permet d'obtenir un produit dont la pression osmotique est parfois suffisante pour entraver tout développement microbien (**Thonart et al., 2004**). Il consiste à éliminer un solvant emprisonné dans un solide en l'évaporant dans la phase gazeuse qui le baigne (**Aller, 1998**).

L'atomisation est une méthode de déshydratation d'un liquide (jus, lait, etc.). Lors de la déshydratation par atomisation, les aliments liquides sont projetés dans une chambre chauffante sous forme de fines gouttelettes, ce qui permet de faire évaporer l'eau et de recueillir l'aliment déshydraté en poudre à la base de l'appareil. Cette méthode est utilisée notamment pour la déshydratation du lait (**Santivarangkna et al., 2008**).

La fluidisation, Cette technique s'applique aux produits solides sous forme de particules ou susceptibles de se désagréger par frottement. Elle consiste à faire passer une phase fluide (très souvent un gaz) à travers un lit de particules, supportées par une grille, pour les mettre en suspension. Le terme fluidisation vient du fait que la suspension gaz/solide est amenée dans un état semblable à celui des fluides. Le but de la fluidisation est notamment d'augmenter la surface de contact gaz-solide pour faciliter le séchage (**Rasul et al., 2000**).

IV. La Lyophilisation

La technique consiste à ôter l'eau d'un produit liquide, pâteux ou solide, à l'aide de l'action combinée du froid et du vide. Le principe de base est que lorsqu'on réchauffe de l'eau à l'état solide à très basse pression, l'eau se sublime, c'est à-dire qu'elle passe directement de l'état solide à l'état gazeux (**De Beer et al., 2006**). La vapeur d'eau (ou de tout autre solvant) quitte le produit et on la capture par congélation à l'aide d'un condensateur ou piège. Cette technique permet de conserver à la fois le volume et l'aspect du produit traité. Elle peut avoir lieu naturellement (séchage en montagne), ou, plus rapidement, dans un lyophilisateur. La lyophilisation comporte généralement trois étapes : la congélation, la sublimation et la dessiccation secondaire (**Chouvenc et al., 2004**).

La lyophilisation s'est développée pendant la seconde guerre mondiale pour le stockage du plasma sanguin (**Pegg, 2002**). Ainsi, pour des vaccins, comme pour un grand nombre de médicaments et de micro-organismes, la lyophilisation est la seule technique permettant une conservation à long terme des principes actifs à l'état sec (**Tang et al., 2004**).

D'après les auteurs (**Koskiniemi, 2010 ; Najafi et Pezeshki, 2013 et Watford et Warrington, 2017**). La lyophilisation est la méthode de séchage la plus utilisée pour les *Pseudomonas*. Mais les changements de température a un effet sur l'oxydation des protéines et de l'ADN ou bien un changement dans la séquence nucléotidique qui peut créer de nouvelles fonctionnalités cellulaires (une mutation) ou conduire au dysfonctionnement des autres (**Watford et Warrington, 2017**).

La première phase de l'opération consiste à congeler le produit, c'est-à-dire à amener l'eau qu'il contient à l'état solide ; ceci implique de lui soustraire de l'énergie. La seconde phase consiste à extraire l'eau du produit par volatilisation en lui fournissant de l'énergie thermique (**Shalev et al., 2002**).

La congélation, au cours de cette phase, la solution liquide de départ est supposée homogène, une partie de l'eau se sépare des substances dissoutes pour cristalliser à l'état pur. Le reste de l'eau se solidifie ensuite peu à peu en mélange avec les solutés pour former une matière interstitielle (**Shuck et al., 2004**).

Un paramètre important à prendre en compte pour l'étape de la congélation est la vitesse de congélation qui conditionne la dimension des cristaux de glace. En effet, plus les cristaux de glace formés sont grands, plus le diamètre des pores est important et par conséquent, plus la vitesse de dessiccation est élevée (**De Angelis et al., 2004**).

Dessiccation, elle se déroule en deux temps : d'abord la sublimation de l'eau cristallisée (séchage primaire, l'eau passe directement de l'état solide à l'état gazeux), puis la phase de désorption et d'évaporation de l'eau liée qui a adopté, lors de la congélation, une forme non cristalline ou vitreuse (séchage secondaire). L'eau présente dans la masse vitreuse doit d'abord subir une diffusion moléculaire au sein de la matière avant d'atteindre les cavités et les canaux qui la mèneront vers l'extérieur (**Caillet et al., 2007**).

IV.1. Impact du séchage sur la viabilité des bactéries

Selon **Berninger et al., (2017)**, le séchage des bactéries est généralement le processus le plus crucial pour déterminer la viabilité. Cependant, les techniques de séchage peuvent entraîner des dommages à la membrane cellulaire, en raison de la constitution de la paroi cellulaires des bactéries Gram - qui est fine et élastique.

L'absence d'acide teichoïque chez les bactéries Gram⁻ réduit encore leur résistance au séchage par rapport aux bactéries Gram positive. Enfin, la plupart des bactéries Gram négative ont des lipopolysaccharides sur leur surface, ces lipopolysaccharides peuvent piéger des molécules d'eau, entraînant une baisse des taux de survie au cours du stockage à long terme (**Miyamoto-Shinohara et al., 2008 ; Mputu Kanyinda et al., 2014**).

Les composants cellulaires les plus exposés pendant le séchage et la conservation de *P. fluorescens* sont : la membrane plasmique, les acides gras polyinsaturés, les protéines et le glutathion (**Mputu Kanyinda et al., 2012 ; Mputu Kanyinda et al., 2012**).

IV.1.1. Modification de la structure membranaire

La structure membranaire est la première cible de la détérioration de l'état physiologique des cellules lors d'une situation de stress (**Béal et al., 2008**), ce qui conduit à une rupture de la paroi cellulaire. Le dommage subi par la membrane cytoplasmique est principalement dû à la déshydratation. Les températures élevées modifient les propriétés des molécules hydrophobes (acides gras) de la membrane et les interactions solvant-protéines au cours du séchage (**Coulibaly et al., 2011**).

IV.1.2. Dommage de l'ADN

Bien que les dégâts subis par la membrane cellulaire pendant la lyophilisation jouent un rôle essentiel dans la perte de viabilité, les dommages des composants cellulaires (ADN et ARN) affectent considérablement la viabilité des cellules lyophilisées. L'ADN est très sensible au séchage, les modifications observées après l'oxydation de l'ADN sont très nombreuses (**Santivarangkna et al., 2007**).

IV.1.3. Dommages des protéines

L'activité des protéines dépend fortement de leur structure native qui dépend partiellement de l'eau. Ces protéines forment avec l'eau des liaisons qui sont rompues lors de la lyophilisation, conduisant ainsi à leur dénaturation (**Mputu Kanyinda et al., 2014**). Les protéines endommagées qui perdent leur état natif peuvent perdre leur fonctionnalité, provoquant un stress métabolique (**Grefte et Michiels, 2020**). De plus, le stress oxydatif conduit à l'oxydation des protéines et il est proposé comme étant le principal déterminant de la sensibilité à la dessiccation chez les bactéries (**Fredrickson et al., 2008 ; García, 2011**).

Le choix d'un composé protecteur approprié est très important pour assurer une viabilité élevée des bactéries pendant la lyophilisation et au cours du stockage (**Lievense et al., 1993 ; Leslie et al., 1995 ; Kawahara, 2008**).

IV.2. La Cryoprotection

L'addition d'agents cryoprotecteurs (CPA) sont essentiels pour réduire les dommages cellulaires causés par le processus de lyophilisation (**Morgan et al., 2006 ; Kawahara, 2008 ; Alonso, 2016**). Les cryoprotecteurs, également connus sous le nom de lyoprotecteurs dans les procédés de lyophilisation, sont des additifs mélangés aux suspensions microbiennes avant la congélation pour minimiser l'influence délétère de la formation de cristaux de glace et pour abaisser le point de congélation pendant les procédés de congélation (**Alonso, 2016**).

Ces composés protecteurs doivent être peu volatils, solubles dans l'eau et n'avoir aucun caractère toxique au niveau cellulaire. Ils ont des origines diverses : polyols, sucres, protéines laitières, acides aminés, antioxydants ou macromolécules (**Béal et al., 2008**).

La plupart des protocoles de conservation des cellules par lyophilisation incluent le lait écrémé comme milieu de séchage car il stabilise les constituants de la membrane cellulaire en créant un revêtement protecteur sur les cellules (**Carvalho et al., 2004**).

Différentes souches de *Pseudomonas* étaient mieux stabilisées en ajoutant 20 g par litre de tréhalose ou fructose (**Schisler et al., 2016**) ou de lactose (**Cabrefiga et al., 2011**), car il maintient la fluidité de la membrane et forme des liaisons d'hydrogène avec les protéines en l'absence d'eau, empêchant ainsi la dénaturation des protéines lors du séchage (**Berninger et al., 2017**).

Notre travail a été réalisé au niveau de laboratoire de PFE du département d'agronomie de l'Université de BLIDA durant une période allant du mois d'Avril jusqu'à la fin du mois de mai. Il porte sur la vérification de la viabilité et l'efficacité des souches de *Pseudomonas*.spp fluorescents lyophilisées et conservées pendant 10 ans à 4°C en comparaison avec les mêmes souches non lyophilisées.

I. Matériel

I.1 Matériels non biologiques

Le matériel non biologique représenté par, la verrerie, l'appareillage (Annexe 1), les milieux de culture sont consignés en (Annexe 3).

I.2. Matériels biologiques

I .2.1. Souches bactériennes

Dans notre étude nous avons utilisé quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (BB9, BB10, F21, PI9) isolées à partir de la rhizosphère de quelques arbres fruitiers de sud Algérien, identifiées et lyophilisées au Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI, Belgique) (Benoussaid et al.,2018) avec agents protecteurs (Glycérol + Malto dextrine) (Mputu et al., 2012).

Tableau 1 : Origine des souches bactériennes lyophilisées (Benoussaid et al., 2018)

Code	Le nom	La région d'isolement	La plante hôte
BB10	<i>P.fluorescens</i>	Bechar (Beni Abbas)	Palmier dattier
BB9	<i>P.putida</i> ou <i>P.monteilli</i>	Bechar (Beni Abbas)	Palmier dattier
F21	<i>P. fluorescens</i> ou <i>P.verronii</i>	Ouargla	Palmier dattier
PI9	<i>P. putida</i> ou <i>P.monteilli</i>	Ghardaïa	Poirier

Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents, nous avons utilisé une souche bactérienne phytopathogène EHH3 de *Agrobacterium tumefaciens* isolée à partir des arbres fruitiers de la région de HTATBA (Tipaza).

I.2.2. Souches fongiques

Pour évaluer l'activité antagoniste des souches bactériennes précédemment citées, nous avons utilisé trois formes spéciales de *Fusarium oxysporum* (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol), *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* (Foln) et *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa)).

Les souches bactériennes et fongiques appartiennent à la collection du laboratoire de Mycologie (Département de Biotechnologie l'Université BLIDA 1).

II.Méthodes

II.1 Purification des souches bactériennes lyophilisées

Une goutte de chaque suspension bactérienne préparée a été prélevé à l'aide de la boucle d'une once et ensuite étalée (ensemencement par épuisement) sur une boîte de pétrie contenant un milieu KB (**King et al., 1954**).

La pureté des souches bactériennes a été vérifiée en réalisant plusieurs repiquages successifs (Figure 3). La production d'un pigment fluorescent a été notée par la présence d'une couleur verdâtre visible à l'œil nu après 24h d'incubation à 28°C (**Meyer et Abdallah, 1978**).

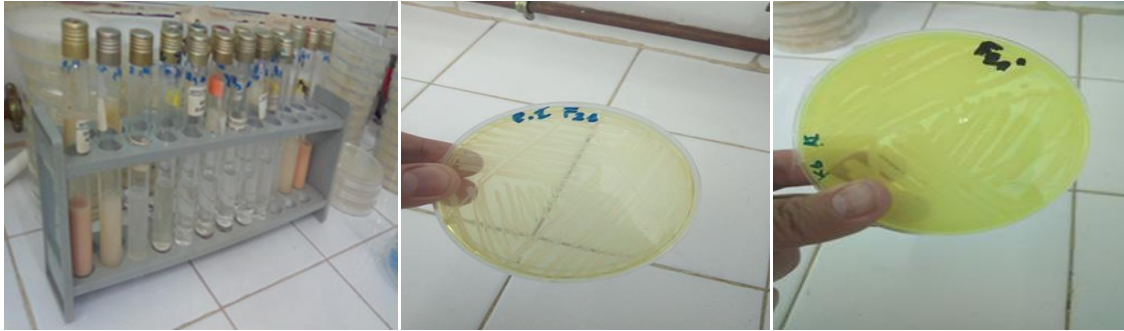


Figure 3 : Purification des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents lyophilisées après plusieurs repiquages.

Pour les souches fraîchement cultivées non lyophilisées, la purification successive a été réalisée par ensemencement sur milieu KB des souches bactériennes conservées dans des tubes à 4°C jusqu'à l'obtention des cultures pures.

II.2. Vérification de l'identité des souches

II.2.1 Coloration de Gram

Selon la méthode de **Gardan et Luisetti (1981)**, à l'aide d'une anse stérile une crème bactérienne de 24h a été déposée dans une goutte d'eau sur une lame propre. Après étalement et séchage avec une chaleur douce, la fixation se fait avec quelques gouttes d'alcool pendant 1 min sur l'étalement séché. La coloration est effectuée en faisant agir sur le frotti le violet de Gentiane (2 min) ensuite la lame est égouttée et lavée avec l'eau distillée jusqu'à la disparition de la couleur violette. Le Lugol est laissé agir pendant 1 min suivi d'un lavage et ensuite l'ajout de l'alcool est laissé pendant 15 sec ,après le frotti est recouvert avec la Fushine pendant 1min qui est suivi d'un lavage à eau distillée. Après séchage de la lame, l'observation par microscope optique (G : 10×100) en additionnant l'huile d'immersion a été réalisée.

Les bactéries qui gardent la coloration violette sont des Gram positive et celles qui se colorent en rose ou rouge sont Gram négative.

Une autre méthode qui confirme les résultats de la coloration, plus rapide et plus simple décrite par **Suslow (1982)**, consiste à déposer sur une lame deux gouttes d'une solution KOH à 3% que l'on ajoute à une crème bactérienne de 24h.

La réponse positive de KOH se traduit par obtention d'un filet visqueux confirme le Gram négative et si le KOH est négatif cela indique que la bactérie est Gram positive.

II.2.2. Test oxydase

Une crème bactérienne jeune de 24h est étalée sur un papier buvard sur lequel une goutte de la réactive oxydase est ajoutée. Après quelques secondes la réponse positive se traduit par l'apparition de la couleur violette (**Guiraur,1998**).

II.2.3. Test catalase

Une goutte de la solution d' H_2O_2 est déposée sur une lame propre sur laquelle une crème bactérienne jeune de 24 h est ajoutée. L'apparition d'effervescence indique une réponse positive (**Prescott et al., 2003**).

II.2.4. La fluorescence

Les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents étudiées sont reconnus par leur effet fluorescent sous lumière UV (365 nm) dans milieu KB (annex1). Cette fluorescence est due à la production d'un pigment appelé pyoverdine (**Adela et al.,2015**).

II.3. Viabilité des souches

II.3.1. Les souches lyophilisées

La viabilité a été évaluée après conservation à 4°C pendant 10 ans selon la méthode du dénombrement direct sur milieu solide.

1g de chaque souche a été en suspension dans un tube à essai contenant 9ml d'eau distillée stérile pour l'obtention de la dilution 10^{-1} . Une série de dilution (10^{-2} à 10^{-11}) a été réalisé pour chaque suspension bactérienne préparée.

Un prélèvement de 0,1 ml de chaque dilution a été réalisée à l'aide d'une pipette ensuite étalée sur un milieu KB (**King et al.,1954**) (Annexe 1) en pris que quelque dilution (10^{-4} 10^{-7} 10^{-9} 10^{-11}). Trois répétitions ont été effectuées pour chaque dilution. Après incubation à 28°C pendant 24 h, les colonies bactériennes ont été dénombrées par un compteur de colonie.

La viabilité des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents a été déterminée avant et après conservation (Tableau 03). Le nombre de colonies a été compté après 24 heures d'incubation et le taux de survie a été exprimé en Unités Formant Colonies (UFC) par ml ou mg après conservation (Nf) et avant la conservation (N0) par le rapport :

$$\text{Viabilité (\%)} = (\text{Nf}/\text{N0}) \times 100.$$

Chaque résultat est la moyenne de trois répétitions (Coulibaly et al, 2009) (Tableau 2 ; Annexe 2)

II.4. Vérification de l'efficacité des souches

II.4.1. Production de quelques métabolites secondaires

II.4.1.1. Synthèse de l'acide indole acétique

La production d'AIA est déterminée selon la méthode standard de (Bric et al.,1991). Une culture bactérienne jeune de 24h de chaque souche a été étalé sur un disque de papier Wattman stérile préalablement déposé sur des boites de pétri contenant le milieu LB (Luria-Bertani) (Annexe 3). Après incubation à 28°C pendant 48h, le papier est récupéré, et traité avec le réactif de Salkowski (Annexe 3). Après 10 à 30 min, la production d'IAA et/ou de ses analogues se manifeste par la formation d'un halo rose rouge autour des colonies. Pour les souches productrices d'autres types d'indoles la coloration est jaune à jaune brune.

II.4.1.2. Production de cyanide d'hydrogène HCN

La production d'HCN a été recherchée par la technique de Bakker et Schippers (1987) sur le milieu TSA (Annexe 3) Une culture bactérienne jeune de 24h de *Pseudomonas* spp.fluorescents a étéensemencé sur la gélose en boites de Pétrie. Un disque du papier Whatman de 8 cm de diamètre a été imbibé dans une solution de picrate de sodium (Annexe 3) et déposé au fond du couvercle de la boite. La boite est fermée avec du para film et incubée à 28°C pendant 96 h. Le résultat positif se traduit par le virage du papier Whatman du jaune vers une couleur orange à marron indiquant la production de HCN.

II.4.1.3. Production de phénazines

La production de phénazine a été recherchée selon la méthode de **Thomashow et Weller (1988)**. Elle consiste à ensemencer le milieu NBY (Nutrient Broth Yeast extract) (Annexe 3) avec une culture de *Pseudomonas* spp fluorescent de 24h puis incubé pendant 48h à 28°C. L'examen des cultures sous UV (356 nm) montre le développement de colonies pigmentées avec des halos sombres noirâtres, révélateur d'une activité phénazinique.

II.4.2. Activité enzymatique

II.4.2.1. Phosphatase :

Des cultures fraîches ont été déposées sur la gélose Pikovskaya (Annexe 3) selon la méthode de spots (disques) puis ont été incubés pendant 96h à 28°C. Les bactéries à activité phosphatasique montrent un halo transparent autour de leurs colonies (**Peix et al., 2001**).

II.4.2.2. Protéase

L'activité protéolytique a été déterminée selon la méthode de **Smibert et Krieg (1994)**, par la mise en culture pendant 48h à 28°C des isolats sur gélose au lait écrémé (Annexe 3) par la méthode des spots au centre de la boîte de petri. Le développement d'un halo autour des colonies indique une réaction positive.

II.4.2.3. Amylase

Des cultures fraîches et jeunes de 24h sont déposées sur gélose nutritive additionnée d'amidon (Annexe 3) par ensemencement par trait au centre de la boîte de Pétrie. Après incubation à 30°C pendant 48h, une solution de Lugol est dispersée sur toute la surface du milieu. La présence de l'amidon dans le milieu donnera une couleur bleue noirâtre. Ceci implique une absence d'activité amylolytiques. En revanche, si l'amidon est hydrolysé, une zone claire (un halo) apparaîtrait autour de la crème bactérienne. Ce qui traduit une présence d'activité amylolytique chez les isolats (**Vinoth Raj et al., 2009**).

II.4.2.4. Production d'ammoniac

Ce test est réalisé selon la méthode de **Capuccino et Sherman (1992)**. Le protocole consiste à ajouter 100µl de culture bactérienne jeune de 24h dans 10ml de bouillon nitraté. Après incubation à 30°C pendant 96 h, une goutte de réactif de Nessler est ajoutée dans chaque tube de bouillon nitraté. L'apparition d'une couleur jaune ou orange indique la production de NH₃.

II.3.2.5. Production de cellulase

Des cultures bactériennes jeunes et fraîches de 24h ont été ensemencées par méthode d'épuisement sur le milieu CMC (Annexe 3) dans des boîtes de pétri, après incubation de 48h à 30°C. L'apparition de cultures bactériennes indique la production de cellulase.

II.5. Activité antagoniste *in vitro*

Le test d'activité antagoniste *in vitro* des quatre souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents lyophilisées vis-à-vis de trois souches fongiques de *Fusarium oxysporum* (*Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*, *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f.sp *lini*) en comparaison avec les mêmes souches non lyophilisées a été réalisé sur trois milieux différents (PDA, King B, Mixte) (Annexe 3) par la méthode de confrontation directe.

II.5.1. Purification des souches fongiques

La pureté des souches fongiques a été réalisé par transplantation successif des disques de champignon de 7 jours dans des boites de Pétrie contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Johnston et Booth, 1983) (Annexe 3). Ces derniers ont été incubés à 25°C pendant 7 jours. Les souches purifiées ont été conservées à 4°C.

II.5.2. Purification de la bactérie phytopathogènes

La pureté de la souche bactérienne EHH3 a été réalisé par des ensemencements successif des cultures bactériennes dans des boites de Pétrie contenant le milieu GN (Gelose Nutritif) (Annexe 3). Ces derniers ont été incubés à 28°C pendant 24h jusqu'à l'obtention de cultures pures.

II.5.3. Principe du pouvoir antagoniste

II.5.3.1. Vis-à-vis des souches fongiques

Le pouvoir antagoniste de nos souches bactériennes sur l'inhibition de la croissance mycélienne des trois formats spéciaux de *Fusarium oxysporum* a été testé sur trois milieux différents : le milieu PDA(Annex3) (favorable au développement des champignons), milieu KB (Annexe 3) ,(favorable au Pseudomonas) et le milieu mixte (Annexe 3) composé de parts égale des deux milieux.

La méthode utilisée est celle décrite par Vincent et al., (1991). Les souches de *Pseudomonas.spp* fluorescents sont étalées sous forme d'une ligne sur une distance de 1,5 cm à partir des deux bords d'une boite de pétrie contenant du milieu gélosé.

Après 24 h d'incubation, un disque fongique de 6 mm venant d'une culture de 7 jours est déposé au centre de la boîte. L'ensemble est incubé à une température de 28°C pendant sept jours. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque interaction.

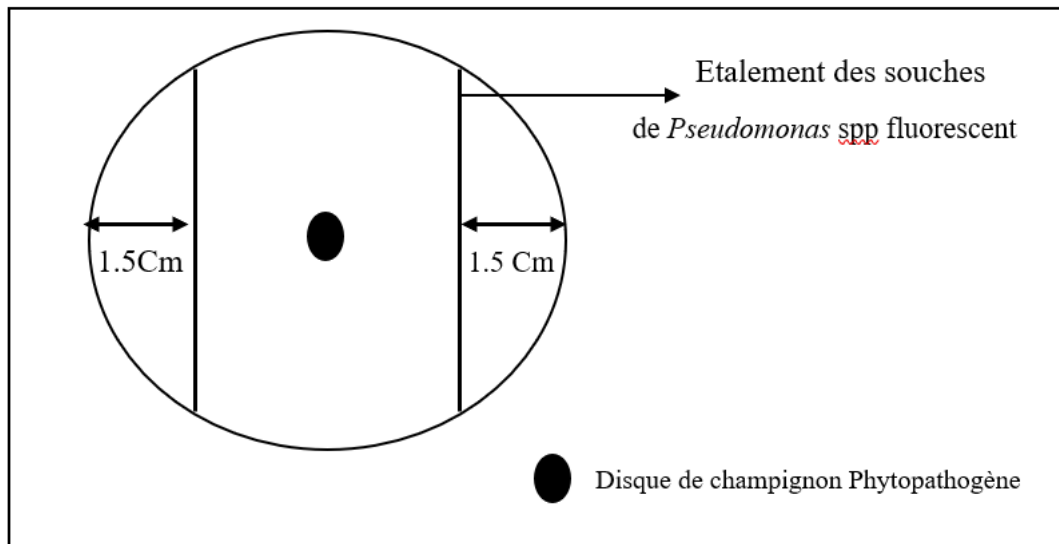


Figure 4 : schéma de la méthode de confrontation directe champignon-bactérie

La réduction du diamètre des colonies mycéliennes des champignons pathogènes en présence des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents comparé au témoin non inoculé, indique la présence d'une activité antagoniste ou non. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la relation suivante (Wang et al., 2002).

La loi :

$$\% \text{ d'inhibition} = ((R-r) \div R) \times 100$$

R témoin : Distance radicale max de la croissance du champignon.

R test : Distance radicale sur une ligne en direction de l'antagoniste.

r : distance de la zone d'inhibition

II.5.3.2. Vis-à-vis de la bactérie

Le pouvoir antagoniste de nos souches bactériennes sur l'inhibition de la croissance de la bactérie phytopathogène EHH3 a été testé sur le milieu KB (Annexe 3).

Trois disques de papier buvard imbibés d'une suspension de chaque souche de *Pseudomonas.spp* fluorescents ont été déposés sous forme de triangle sur le milieu GN (Annexe 3) préalablementensemencée par des stries serrées de la bactérie phytopathogène EHH3 (Figure 5). Deux répétitions ont été réalisées pour chaque interaction. L'ensemble est incubé à une température de 28°C pendant 48h.

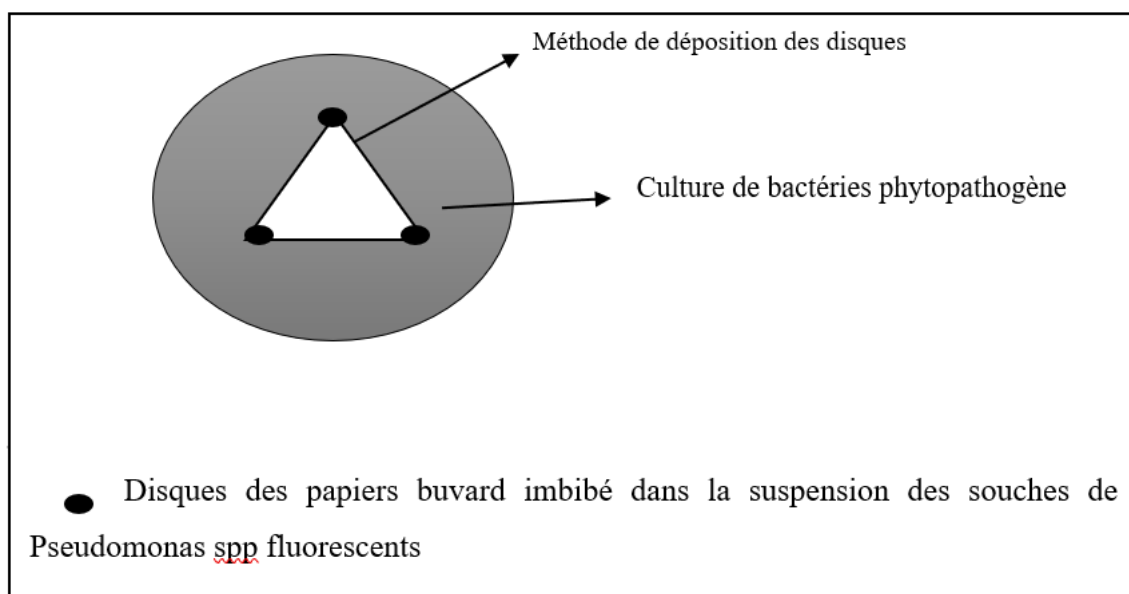


Figure 5 : Schéma de la méthode de disque d'interaction bactérie- bactéries

I. Caractérisation des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents

Après purification, les souches bactériennes ont montré sur le milieu KB des caractères culturaux très rapprochés. D'une manière générale, les colonies présentent un contour régulier, la coloration est souvent crème et parfois beige. Pour toutes les souches, l'aspect des colonies est lisse, leur élévation est convexe et le diamètre varie de 0.5 à 4 mm et cela en fonction de l'âge de la culture. Les résultats de la caractérisation physiologique et biochimiques sont représentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Caractérisation physiologique et biochimique des souches de *Pseudomonas* spp fluorescent.

Souches	Tests	Gram	KOH	CAT	OXY	FLUO
BB10	LY	-	+	+	+	+
	NL	-	+	+	+	+
BB9	LY	-	+	+	+	+
	NL	-	+	+	+	+
PI9	LY	-	+	+	+	+
	NL	-	+	+	+	+
F21	LY	-	+	+	+	+
	NL	-	+	+	+	+

LY:lyophilisées / NL: non lyophilisées /Oxy : oxydase / Cat : catalase /Fluor : fluorescence.

Les quatre souches étudiées (lyophilisées et fraîchement utilisées) produisent sur milieu KB des pigments fluorescents visibles à l'œil nu (Tableau 2 ; Figure 6). L'intensité de la fluorescence est variable selon les souches. Nous avons constaté que la fluorescence varie non seulement en fonction des souches mais aussi selon l'âge de la culture. La coloration et l'intensité du pigment émis varie du vert jaune au jaune brun. Ces mêmes observations ont été signalées par **Digat et Gardan (1978)**.

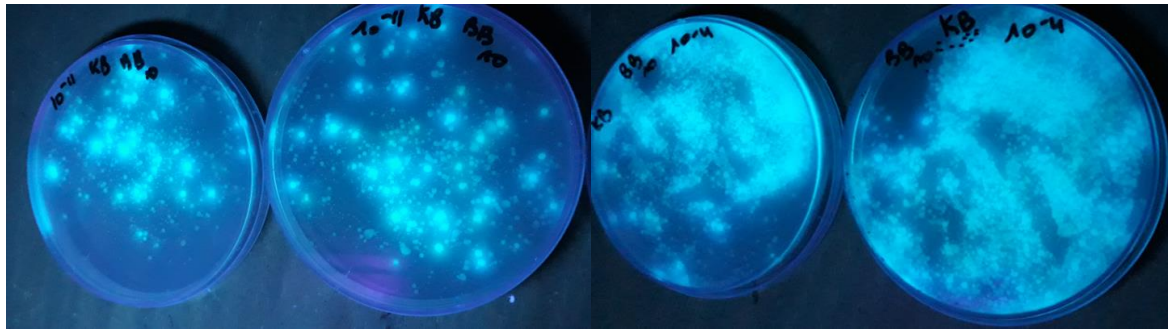


Figure 6 : La fluorescence des souches de *Pseudomonas fluorescent* sous lumière UV.

Les sidérophores, sont des molécules de faible poids moléculaires. Ils sont synthétisés et sécrétés par beaucoup de micro-organismes en réponse aux carences de fer (Renshaw et al.,2002). Ces composés se lient avec le Fe^{3+} , et le transportent dans la cellule microbienne par des récepteurs membranaires spécifiques afin de le solubiliser (Neilands,1995). Ces derniers sont utilisés pour assurer la nutrition en fer des microorganismes. Parmi les bactéries productrices des sidérophores les *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Dans le sol, deux espèces de *Pseudomonas* à savoir ; *P. fluorescents* et *P. putida*, ont développé une stratégie active pour la prise de fer, cette stratégie est basée sur des sidérophores (appelé souvent pyoverdine qui montrent une affinité élevée pour le Fe^{3+} (Lemanceau et al.,2007).

Le test de la coloration de Gram des souches de *Pseudomonas* spp fluorescent a montré après observation de la coloration rose que les quatre souches sont des bacilles à Gram négative (Tableau 2 et Figure 7). La réaction KOH est positive, un filet visqueux apparait dès qu'il y a contact entre crème bactérienne et la solution KOH (Figure 7), ce qui indique que KOH positive, alors nous avons confirmé ce qui confirme que ces souches sont des Gram négative. La souche BB10 comparativement aux souches PI9, BB9 et F21 présente une viscosité importante (Tableau 2).

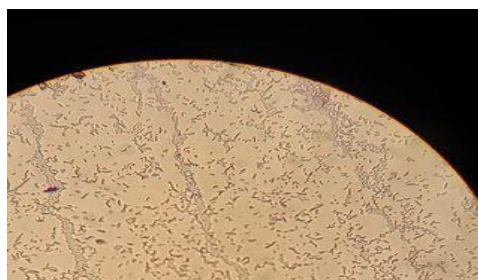


Figure 7 : Observation microscopique de coloration de Gram ($\times 100$)



Figure 8 : Résultat du test KOH des souches étudiées

La recherche de l'oxydase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram négative. Les résultats de ce test chez les *Pseudomonas* spp fluorescent lyophilisés et non lyophilisé sont positives (**Benoussaid, 2018**). Dans notre travail nous avons confirmé ces résultats par l'apparition de la couleur violette, ce qui confirme encore la taxonomie des souches testées.

La catalase est une enzyme qui permet la dismutation du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) en eau et dioxygène. Les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents lyophilisées et non lyophilisées ont une catalase positive indiquée par l'observation de l'effervescence (Figure 9).



Figure 9: Effervescence des souches de *Pseudomonas* spp.fluorescent

Suite à ces différents tests des caractères cultureux et les caractères physiologiques et biochimiques, nous constatons une nette stabilité des réponses obtenues en comparaison avec les réponses obtenues par **Benoussaid et al.(2018)** et **Benoussaid (2019)**.

II. Viabilité des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisées et conservation à 4°C pendant 10 ans

Tableau 3 : Le taux de viabilité des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent avant et après la conservation 4°C .

Souches	Avant stockage (cfu/g)	Après 3 ans de stockage (cfu/g)	Après 5 ans de stockage (cfu/g)	Après 10 ans de stockage (cfu/g)
F21	$6.33 \times 10^9 (\pm 2,52.10^9)^a$	$7.77 \times 10^8 (\pm 2,08.10^8)^a$ (12.27) ^b	$7.66 \times 10^8 (\pm 2,73.10^8)^a$ (12) ^b	$1.55 \times 10^9 (\pm 2.18.10^9)^a$ (24.48) ^b
BB10	$3.8 \times 10^{10} (\pm 8,54.10^9)^a$	$9.30 \times 10^9 (\pm 5,29.10^8)^a$ (24.47) ^b	$1.08 \times 10^9 (\pm 2,57.10^8)^a$ (2.84) ^b	$3.95 \times 10^9 (\pm 5.45.10^8)^a$ (10.39) ^b
BB9	$4 \times 10^9 (\pm 2,00.10^9)^a$	$9 \times 10^8 (\pm 2,00.10^8)^a$ (22.50) ^b	$8.2 \times 10^8 (\pm 1.24.10^8)^a$ (20.5) ^b	$2.75 \times 10^9 (\pm 6.81.10^9)^a$ (68.75) ^b
PI9	2.2×10^{11}	$7.1 \times 10^{10} (\pm 4,2.10^{10})^a$ (32.27) ^b	$2.18 \times 10^{10} (\pm 2,10.10^9)^a$ (30.7) ^b	$9.96 \times 10^9 (\pm 1.41.10^{10})^a$ (4.52) ^b

a : écart type issu de trois répétions.

b : Viabilité(%) des cellules lyophilisées et stockées à 4°C

Dans notre étude, les résultats de la viabilité des quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisée ont été déterminée après 10 ans de conservation (Tableau 3; Figure10). Ces résultats confirment la viabilité de nos souches avec des taux différents.

Comme présente le tableau (3), la viabilité des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents évaluée par dénombrement sur gélose KB reste stable après 10 ans de stockage en comparaison avec les résultats avant stockage et après 3 ans et 5 ans de stockage (**Benoussaid,2019**). Le taux de survie varie entre 4.52% et 68.75%. Le taux de viabilité des souches F21 et BB9 a augmenté par rapport aux études précédentes, mais chez PI9 le taux de survie a diminué. La souche BB10 reste légèrement stable après stockage.

L'utilisation des composés protecteurs avant la lyophilisation ont permis de maintenir une viabilité remarquable à la fin de la lyophilisation et au cours du stockage de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

De nombreux auteurs dont **Palmfeldt et al., (2003)** et **Stephan et al., (2007)** ont mis en évidence l'apport des composés protecteurs sur la viabilité de *Pseudomonas* lors des opérations de séchage. Le choix d'un composé protecteur approprié est très important pour assurer une viabilité élevée des bactéries pendant la lyophilisation et au cours du stockage (**Kawahara, 2008**).

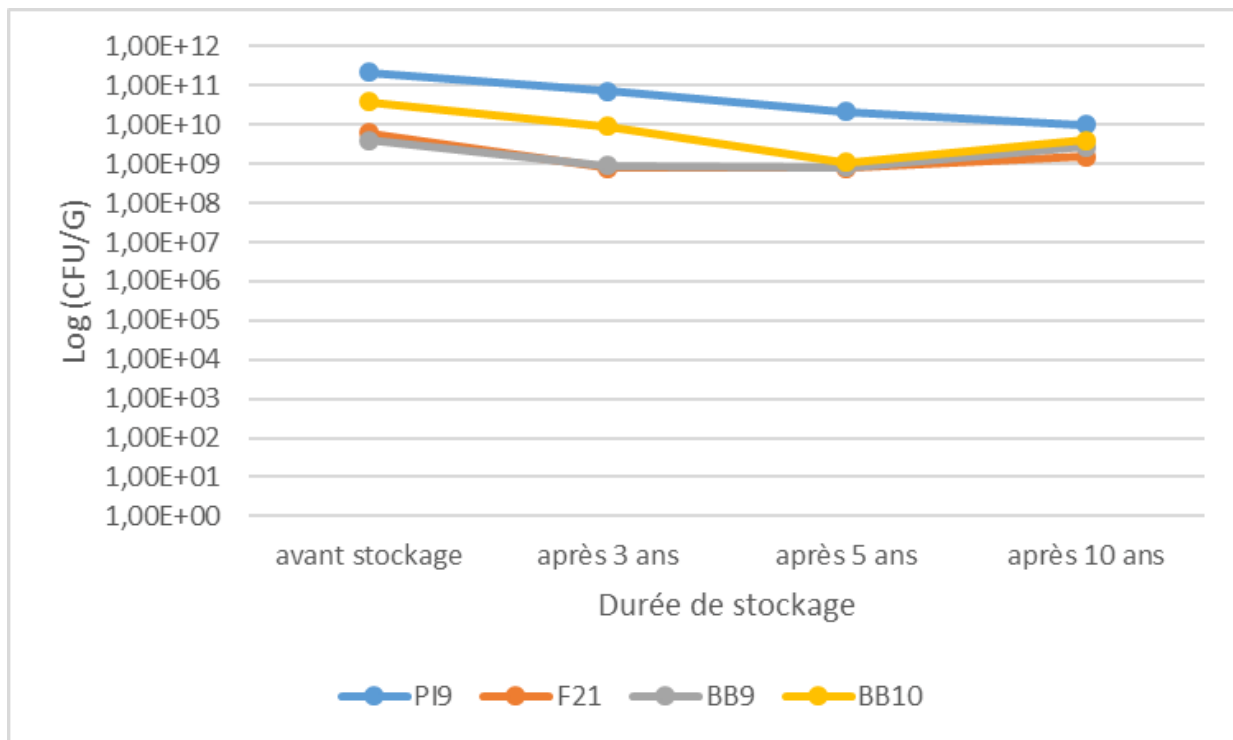


Figure 10 : Evolution des concentrations des quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent avant, et après 3 ans , 5ans et 10 ans de la conservation à 4°C.

III. Etude d’efficacité des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents

III.1. Production de quelques métabolites secondaires

Les résultats de la recherche de la production de métabolites secondaires testés sur quatre isolats de *Pseudomonas* spp.fluorescents lyophilisée et quatre isolats de *Pseudomonas* spp fluorescents non lyophilisée sont illustrés dans le tableau 4:

Tableau 4: Principaux métabolites secondaires produits par *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisés et non lyophilisés.

	Métabolites Secondaires	AIA	HCN	PHZ	PHOS	Amylase	Ammoniac	Protéase	Cellulase
Souches lyophilisées	%	100	100	50	100	50	100	100	100
Souches non lyophilisées	%	100	100	50	100	50	100	100	100

AIA : Acide Indole Acétique / HCN : Cyanure d’Hydrogène/ PHOS : Phosphatase / PHZ : phénazine

Selon le tableau 4, 100% des souches non lyophilisées et lyophilisées ont le pouvoir de produire l'HCN, phosphatase, protéase, cellulase et l'ammoniac, 75% produisent de l'AIA, 50% produisent les phénazines, et l'amylase.

Tableau 5 : les résultats de la production de quelques métabolites secondaires chez les souches lyophilisées et non lyophilisées de *Pseudomonas* spp fluorescents

Les Souches		AIA	Analogue AIA	HCN	PHZ
BB10	LY	-	+	+	-
	NL	-	+	+	-
BB9	LY	-	+	+	+
	NL	-	+	+	+
PI9	LY	-	+	+	+
	NL	-	+	+	+
F21	LY	+	-	+	-
	NL	+	-	+	-

➤ Synthèse de l'acide indole acétique (AIA)

La production qualitative de l'acide indole acétique et / ou ses analogues a été observée chez les souches lyophilisées et non lyophilisées, après traitement des souches avec le réactif de salkowski (annexe) pendant 30 min. Les résultats observés montrent que la souche F21 lyophilisée et non lyophilisée a développé une coloration rose ce qui indique la production d'AIA. Les autres souches (BB10, BB9, PI9) lyophilisée et non lyophilisée ont développé une coloration jaune-brun ce qui indique la production d'autres types d'AIA (analogues) (Figure 11 et 12).

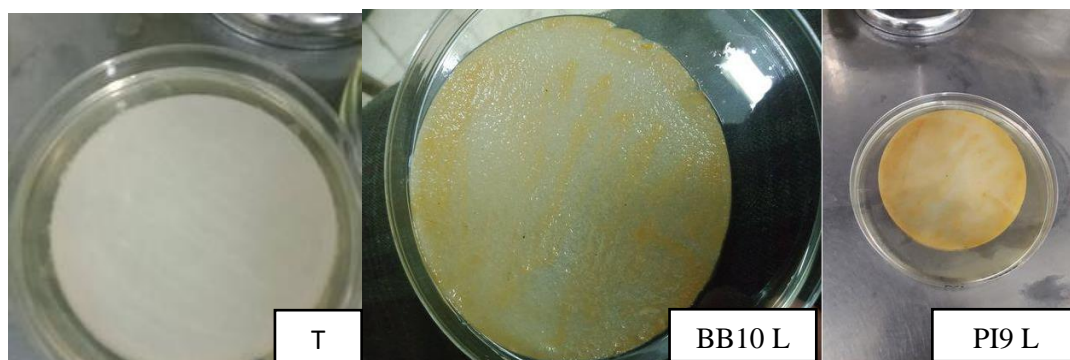


Figure 11 : Production d'autres types d'AIA par quelques souches *Pseudomonas* spp fluorescents lyophilisés.

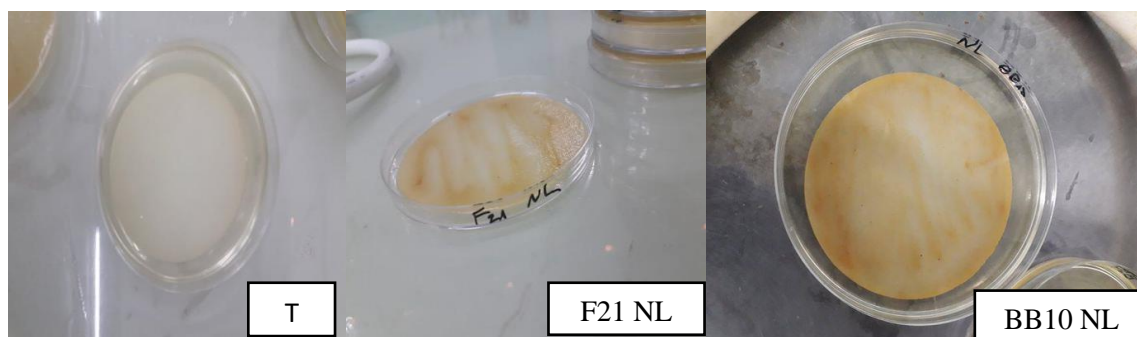


Figure 12 : Production d'autres types d'AIA par quelques souches *Pseudomonas* spp fluorescents non lyophilisés.

Presque toutes les bactéries rhizosphériques sont capables de produire de l'Acide-Indole Acétique (AIA) (Dastager et al., 2010). Plus précisément les *Pseudomonas* spp fluorescents (Forlani et al., 1995 et PerselloCartieaux et al., 2003). La production de cette hormone par *Pseudomonas* est bénéfique pour la croissance et le développement des plantes. Elle joue un rôle très important dans la division cellulaire, l'élongation des racines, la prolifération des poils absorbants et dans le mécanisme de tolérance de la plante (Sandhya et al., 2010).

Les exsudats racinaires sont une source naturelle de L-tryptophane qui est considéré comme le précurseur de la synthèse d'AIA par les rhizobacteries (Dastager et al., 2010). La production de ce composé est variable entre les souches de différentes espèces. Cette variation est aussi influencée par les conditions de culture, la phase de croissance et la disponibilité du substrat (Miraza et al., 2001).

➤ Production de cyanure d'hydrogène

Une réaction positive pour l'ensemble des souches lyophilisées et non lyophilisées indique une production importante d'HCN dans le milieu TSA (Annexe03) après 96 h d'incubation à 28°C (Figure13)

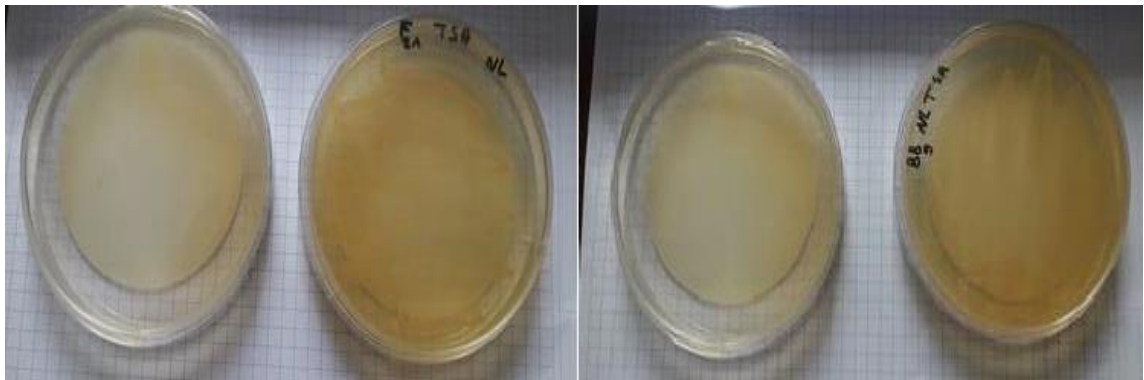


Figure 13 : production d'HCN par les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents

La production du métabolite secondaire cyanure d'hydrogène (HCN) est bien documenté chez les procaryotes en particulier chez plusieurs espèces de *Pseudomonas fluorescentes* comme *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. protegens*. Ils ont déjà été étudiées par patty (Noshin et al,2022). Il est impliqué dans la suppression d'agents pathogènes comme *Thielaviopsis basicola*, *Septoria tritici* et *Puccinia recondita* (Ramette et al., 2003). Les travaux de plusieurs auteur (Siddiqui et al.,2005 ; Frydenlund Michelsen et Stougaard, 2012 et Reetha et al.,2014) ont démontré la capacité des différentes souches de *Pseudomonas fluorescentes* à produire de l'HCN. La production d'HCN au niveau de l'adaptation à la rhizosphère peut être avantageuse.

Pour acquérir des nutriments (Ellis et al., 2000), sa production peut même inhiber la croissance de plusieurs champignons phytopathogènes via la phase gazeuse in-vitro (Blummer et Haas, 2000).

➤ Production de phénazines

Les résultats se manifestent sous lumière UV par l'apparition de colonies noirâtres. Dans notre étude les résultats sont positifs chez les souches (BB9, PI9) lyophilisée et non lyophilisée et négatives chez les autres souches (BB10, F21) lyophilisée et non lyophilisée.

Beaucoup de *Pseudomonas* spp. fluorescent ont été identifiés comme producteurs de phénazine (Perneel et al., 2006). L'activité antibiotique provient d'une réaction d'oxydoréduction sur la phénazine, (Gauthier, 2013), cette activité peut supprimer les agents pathogènes des plantes telles que *F.oxysporum* et *Gaeumannomyces graminis* (Beneduzi et al., 2012).

La production de phénazine joue également un rôle dans plusieurs processus physiologiques, notamment la formation de biofilms (Maddula et al., 2006 ; LeTourneau et al., 2018) et la réduction du fer (Hernandez et al., 2004).

Plusieurs travaux précédents ont démontré la production de phénazine par les *Pseudomonas* (Thomashow et Weller, 1988 ; Perneel et al., 2006 ; Park et al., 2010 ; Parejko et al., 2013 et Morrison et al., 2017).

➤ Production de quelques enzymes

Pseudomonas spp fluorescent produit plusieurs enzymes qui jouent un rôle important dans la phytoprotection et phytosimulation des plantes, les résultats sont démontrés dans le tableau (6).

Tableau 6 : les résultats de la production de quelques enzymes chez les souches *Pseudomonas* spp fluorescent lyophilisé et non lyophilisées

Les Souches		Phosphatase	Protéase	Amylase	Ammoniac	Cellulase
BB10	LY	+	+	+	+	+
	NL	+	+	+	+	+
BB9	LY	+	+	-	+	+
	NL	+	+	-	+	+
PI9	LY	+	+	+	+	+
	NL	+	+	+	+	+
F21	LY	+	+	-	+	+
	NL	+	+	-	+	+

➤ Phosphatase

Le test de solubilisation de phosphatase indique que toutes les souches testées synthétisent l'allophosphatase pour solubiliser le phosphore inorganique. La décoloration de milieu de pikovskaya (Annexe 3) et/ou le développement d'un halo clair autour des spots indique une réaction de phosphatase positive. (Figure 14).

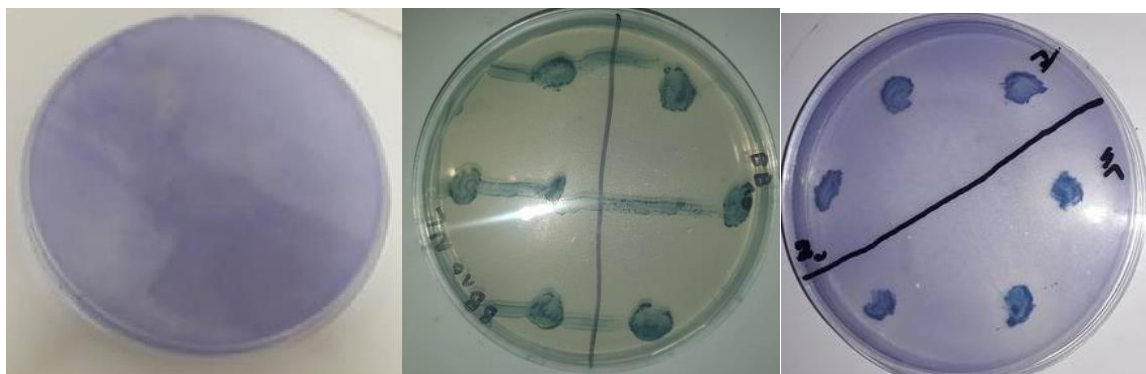


Figure 14 : Production de phosphatase par les souches de *Pseudomonas* spp fluorescent lyophilisé et myophilisé.

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents, jouent un rôle de phytostimulateur car elles augmentent la concentration en phosphore soluble, il existe deux méthodes : soit par minéralisation des phosphates organiques, grâce à des phosphatases, soit par solubilisation des phosphates inorganiques, sous l'effet d'acides (**Lemanceau, 1992**). Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués, le principal est de produire des acides organiques, qui sont signalés pour solubiliser le phosphate insoluble en diminuant le pH ou en complexant le cation qui est lié au phosphate (**Park et al., 2009**).

➤ Protéase

L'activité protéolytique a été testée sur le milieu gélose au lait (Annexe 3). Toutes les souches bactériennes lyophilisées et non lyophilisées ont montrées une réaction positive dans la dégradation des protéines. Développement d'un halo clair autour de spot indique une réaction positive, (figure 15).

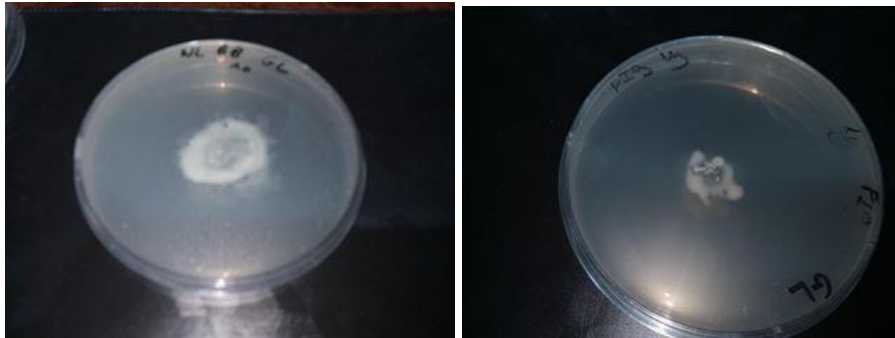


Figure 15 : Production des enzymes protéolytique par *Pseudomonas* spp fluorescents

Les protéases sont les enzymes industrielles les plus importantes exécuter une grande variété de fonctions et avoir diverses applications biotechnologiques importantes (**Kalaiarasi et Sunitha, 2009**). Ils sont des enzymes extracellulaires sécrétées par les bactéries, principalement des espèces de *Pseudomonas* (**Rajmohan et al., 2002**). Ils jouent un rôle dans la dégradation des parois cellulaires fongiques (**Stanier et al., 1966**). Malgré la différence dans les conditions de croissance optimales, la production de protéases extracellulaires semble être une caractéristique commune parmi les membres de *P. fluorescens*.

Nombreux travaux confirment la production d'enzyme de protéase par les souches de *Pseudomonas* (**Koka et Weimer, 2000 ; Rajmohan et al., 2002 et Kalaiarasi et Sunitha, 2009**).

➤ Amylase :

L'activité amylolytique des souches bactériennes est testée sur milieu gélose additionné d'amidon (Annexe 3). La lecture se fait en utilisant du Lugol sur la culture, le résultat : apparition d'un halo claire indique une production.

L'activité amylolytique est positive chez toutes les souches (BB10, BB9, PI9, F21) lyophilisées et non lyophilisées. (Figure 16).



Figure 16 : Résultat de la production amylolytique chez les souches de *pseudomonas* spp fluorescent.

Les bactéries du genre *Pseudomonas* produisent un certain nombre d'enzymes extracellulaires, tels que la lipase et l'amylase (Khannous et al.,2014). Les bactéries dégradant l'amidon sont les plus importantes pour les industries telles que l'alimentation, la fermentation, (Sunder Alariya et al.,2013).

➤ Production d'ammoniac

La production de l'ammoniaque est révélée chez toutes les souches lyophilisées et nonlyophilisées par l'addition de réactif de Nessler. Le résultat positif se traduit par le virage de la couleur du milieu vers rouge orangé (Figure 17).

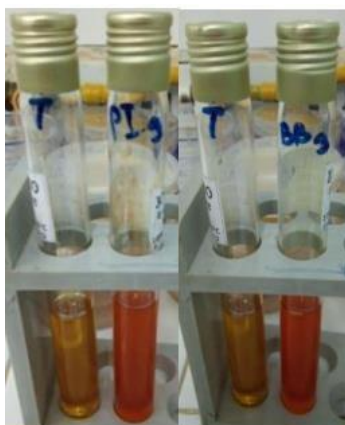


Figure 17 : Production d' NH_3 par toutes les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Les rhizobactéries peuvent améliorer indirectement la croissance des plantes par la production d'ammoniac (**Joseph et al., 2007**) qui joue un rôle important dans la signalisation lors de l'interaction plante-rhizobactéries (**Becker et al., 2002**). Les espèces de *Pseudomonas* sont connues avoir un rôle important dans la suppression de certaines maladies apparemment via la production d'antifongiques métabolites tels que l'ammoniac (**Hamid et al., 2003**). Il est bien établi que l'ammoniac libéré par les bactéries accélère l'activité de la glutamine synthétase (**Sood et al., 2002**).

➤ Cellulase

Toutes les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents produisent la cellulase d'après les résultats dutest. La Lecture est apparition d'une culture bactérienne sur le milieu CMC (Annexe03). Dans ce milieu la cellulose est la seule source de carbone donc les bactéries testées produisent la cellulase (Figure 18).



Figure 18: la production de cellulase par des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents

Les *Pseudomonas* sont un genre très diversifié (voir les revues récentes de (**Peix et al., 2009-Silby et al., 2011**), et la formation de biofilm et l'expression de la cellulose sont maintenant connues pour être courantes parmi les *Pseudomonas* environnementales de l'eau, du sol, associées aux plantes et phytopathogènes (**UdeSArnold et al., 2006**). Cependant, le rôle écologique de la cellulose et l'avantage qu'elle confère à ces bactéries sont mal compris.

Les membres de *Pseudomonas* ont été signalés comme ayant une activité cellulolytique vis-à-vis des matériaux cellulosiques (**Bakare et al., 2005**). Les *Pseudomonas* produisent des quantités significatives de cellulases qui peuvent être encore améliorées par des conditions de culture contrôlées. Ces enzymes ont montré une activité significative vis-à-vis de la cellulose, contrairement aux cellulases de certaines autres bactéries qui montrent une activité très faible ou nulle contre la cellulose cristalline (**Gatamet et al., 2010**).

III.2. Résultats de test d'activité antagoniste *in vitro*

Le test d'antagonisme a été réalisé par les quatre souches de *Pseudomonas*.spp fluorescents lyophilisés en comparaison avec les souches non lyophilisées vis-à-vis trois forme de champignon *Fusarium oxysporum* (Foa .Fol . Foln).

Les tests d'antagonisme *in vitro* montre que les quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (BB10, BB9, PI9et F21) exercent des effets antagonistes vis-à-vis les trois formes spéciales de *Fusarium oxysporum* (*Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*(Foa), *Fusarium oxysporum* f.sp *lecopersici*(Fol), *Fusarium oxysporum* s.sp *lini*(Foln)sur les trois milieux de culture (PDA, KB et le milieu mixte), mais à des degrés divers. Cette variation dépend des souches antagonistes utilisées et aussi des milieux de cultures. Cette inhibition a été détectée après 7 jours de confrontation.

➤ Sur milieu PDA

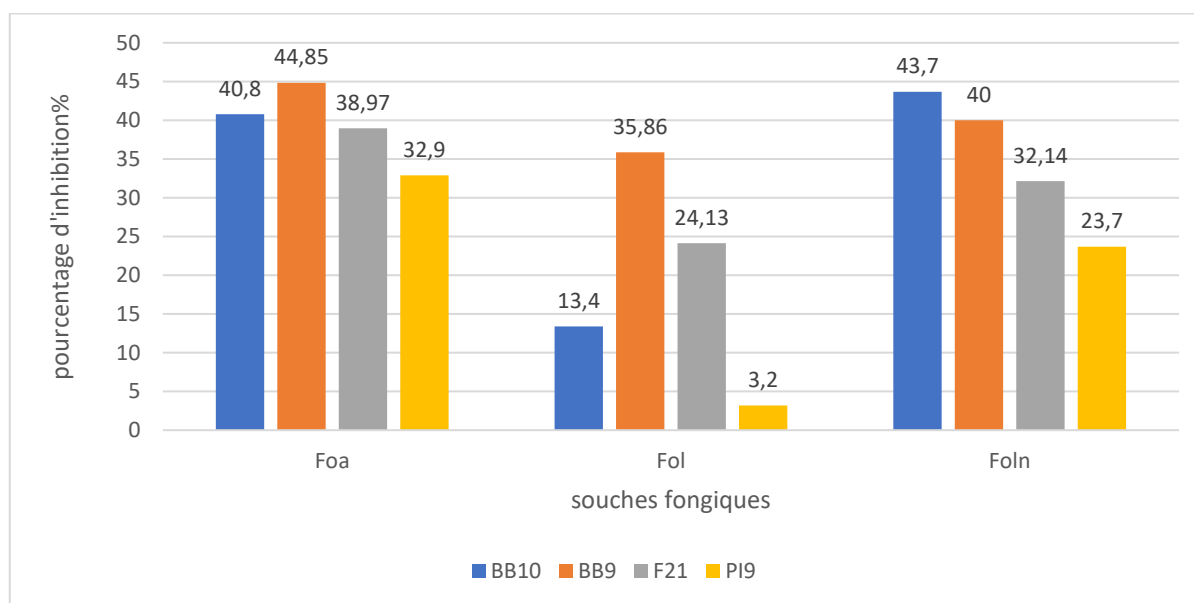


Figure 19 : Le taux d'activité antagoniste des quatre souches de *Pseudomonas* spp fluorescent lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de *Fusarium* sur milieu PDA.

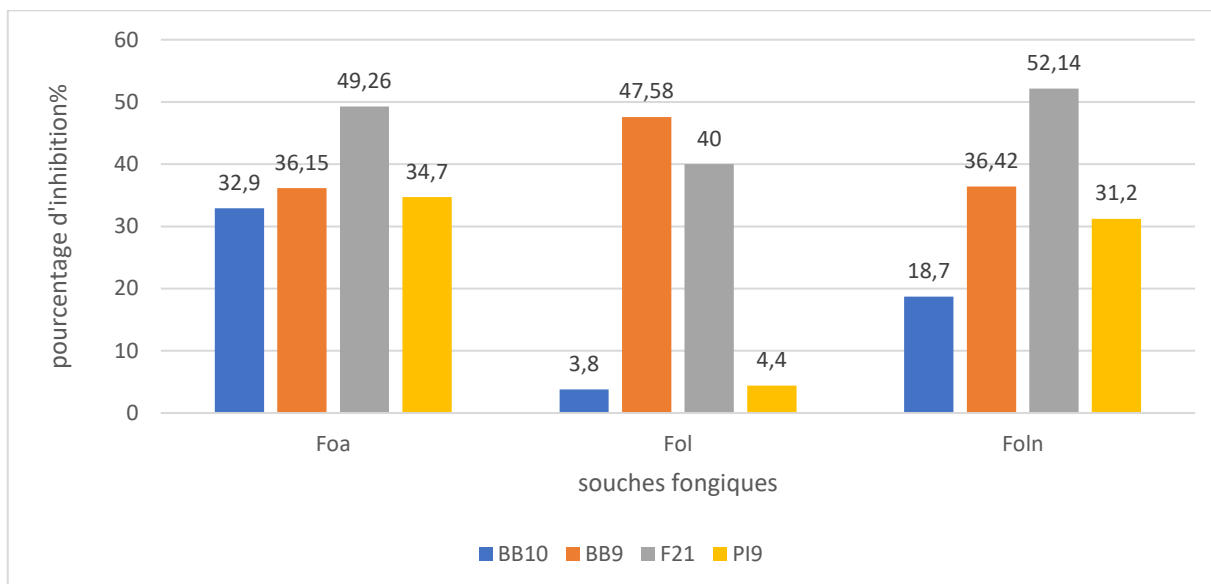


Figure 20 : Le taux d’activité antagoniste des quatre souches de *Pseudomonas* spp fluorescent non lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de *Fusarium* sur milieu PDA

A travers les résultats obtenus en comparaison avec le témoin (absence des antagonistes), pour les lyophilisats, l’effet antagoniste le plus important a été enregistré avec les souches BB9 vis-à-vis Foa avec un taux d’inhibition 44.85 %. Le taux le plus faible a été signalé avec la souche PI9 vis-à-vis Fol avec un taux d’inhibition 3.2 %,pour les souches non lyophilisées, l’effet antagoniste le plus faible a été signalé par la souche bactérienne BB10 vis-à-vis Fol avec un taux d’inhibition de 3.8%, et le taux le plus élevé a été enregistré par la souche bactérienne F21 vis-à-vis Foln avec un taux d’inhibition de 52.14%.

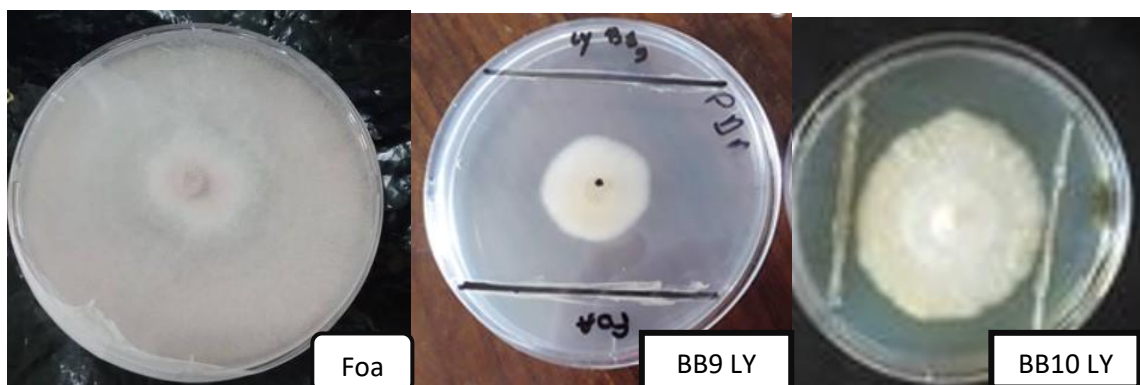


Figure 21 : Activité antagoniste de la souche BB10 et BB9 lyophilisées vis-à-vis Foa sur milieu PDA.

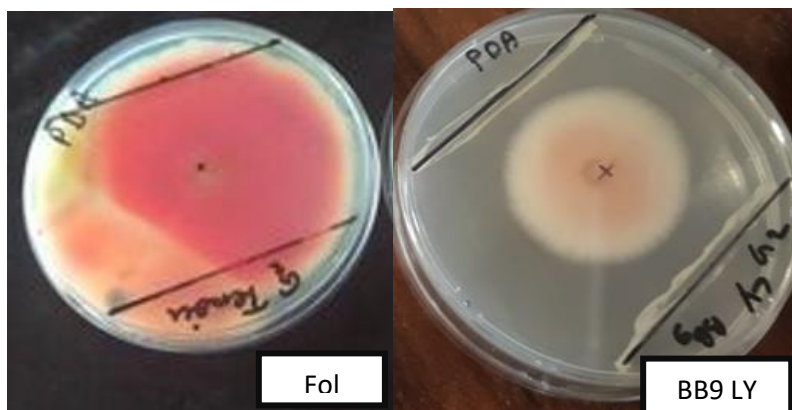


Figure 22 : Activité antagoniste de la souche BB9 lyophilisées vis-à-vis Fol sur milieu PDA.



Figure23 : Activité antagoniste de la souche BB9 et F21 lyophilisées vis-à-vis Flon sur milieu PDA.

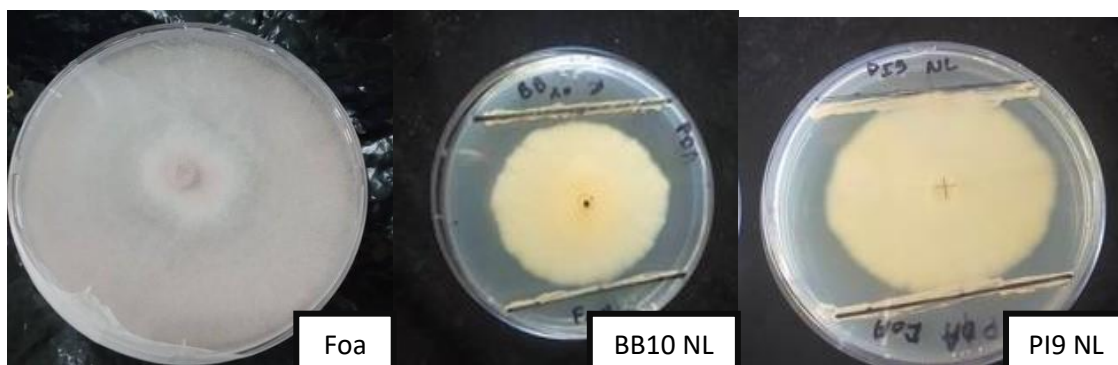


Figure 24 : Activité antagoniste de la souche BB10 et PI9 non lyophilisées vis-à-vis Foa sur milieu PDA.

➤ Sur milieu KB

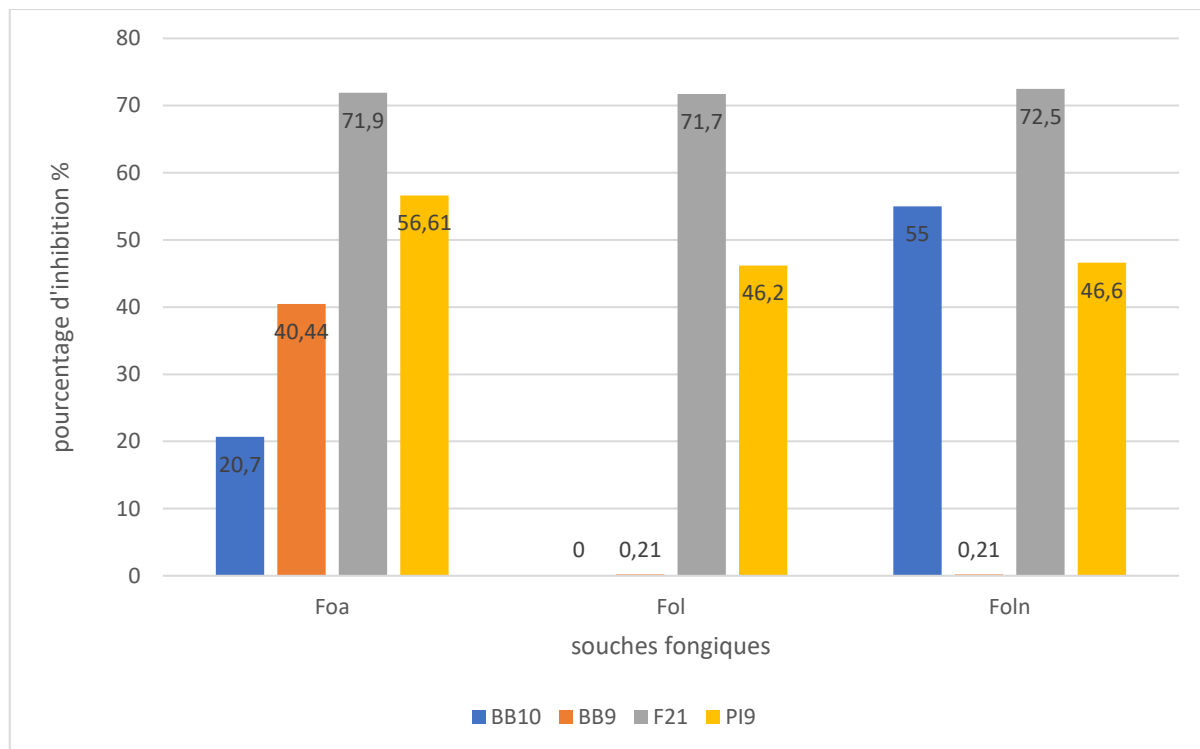


Figure 25 : Le taux d'activité antagoniste des quatre souches de *Pseudomonas* spp fluorescent lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de *Fusarium* sur milieu KB.

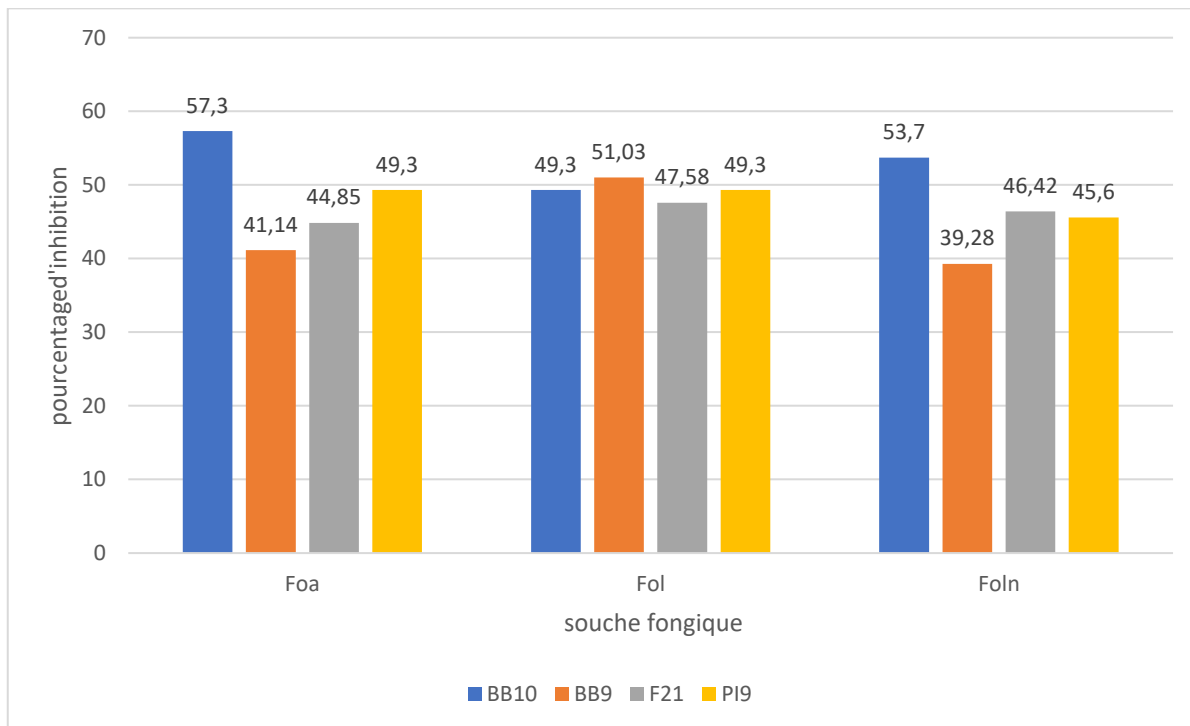


Figure 26: Le taux d'activité antagoniste des quatre souches de *Pseudomonas* spp fluorescent non lyophilisées fluorescent vis-à-vis les trois formes spéciales de *Fusarium* sur milieu KB

Nous avons noté que le lyophilisat F21 vis-à-vis Foln montre un taux d'inhibition le plus élevé sur milieu KB avec un taux d'inhibition 72.5 %, le taux d'inhibition le plus faible a été enregistré avec la souche BB9 vis-à-vis Foln et Fol avec un taux d'inhibition 0.21%

Pour les souches non lyophilisées, L'effet antagoniste le plus important a été enregistré par la souche BB10 vis-à-vis Foa avec un taux d'inhibition de 57.30%, alors que le taux le plus faible a été noté par la souche bactérienne BB9 vis-à-vis Foln avec un taux d'inhibition de 39.28%.

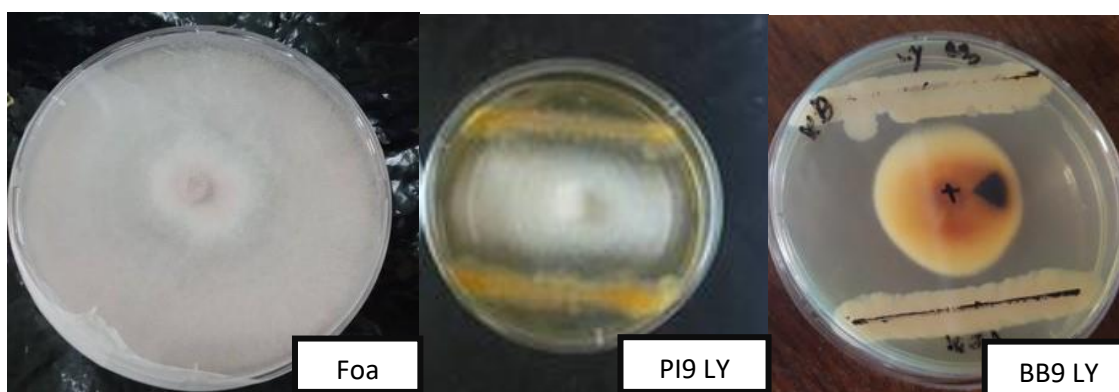


Figure27 : Activité antagoniste de la souche BB9 ET PI9 lyophilisées vis-à-vis Foa sur milieu KB

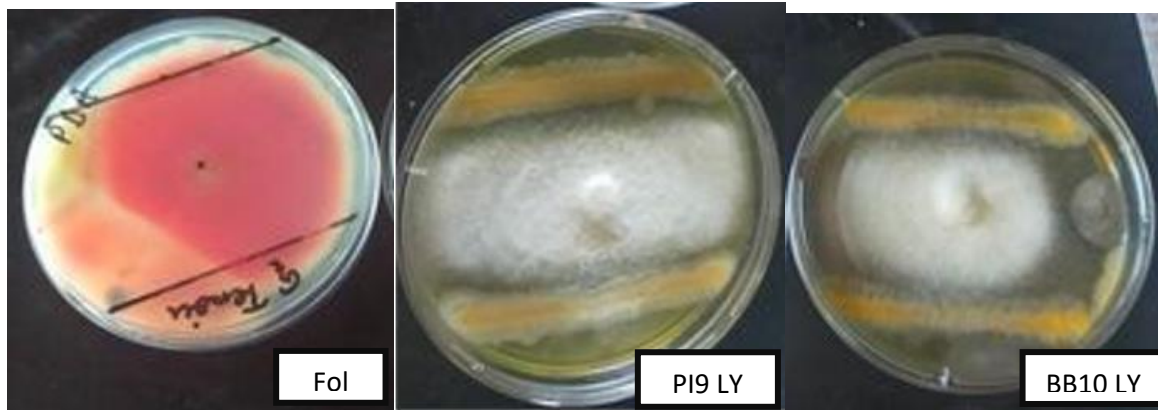


Figure 28: Activité antagoniste de la souche BB10 ET PI9 lyophilisées vis-à-vis Fol sur milieu KB

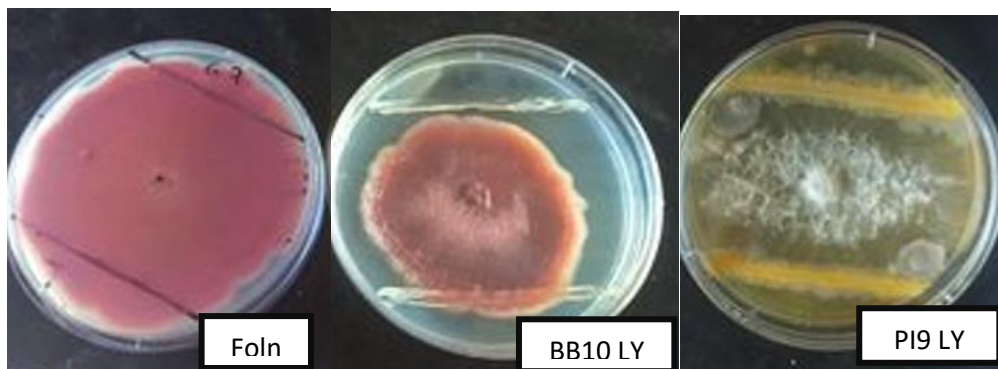


Figure29 : Activité antagoniste de la souche BB10 et PI9 lyophilisées vis-à-vis Foln sur milieu KB.

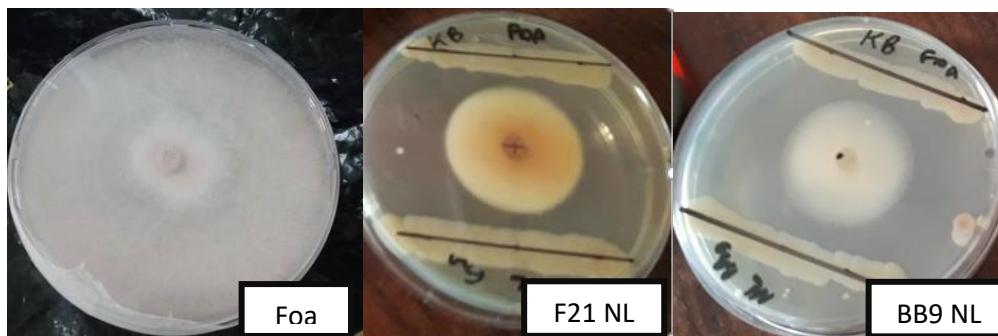


Figure30 : Activité antagoniste de la souche BB9 et F21 non lyophilisées vis-à-vis Foa sur milieu KB.

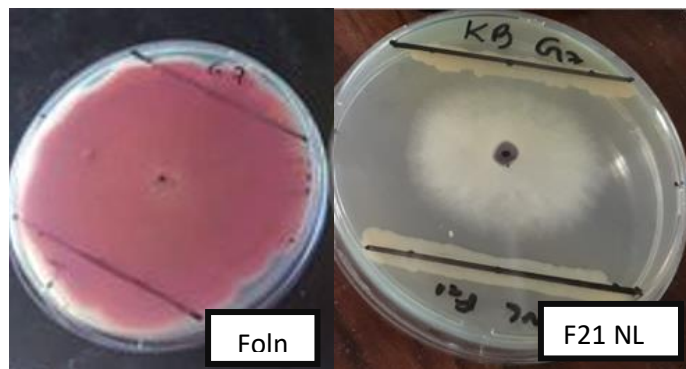


Figure 31 : Activité antagoniste de la souche F21 non lyophilisées vis-à-vis Foln sur milieu KB

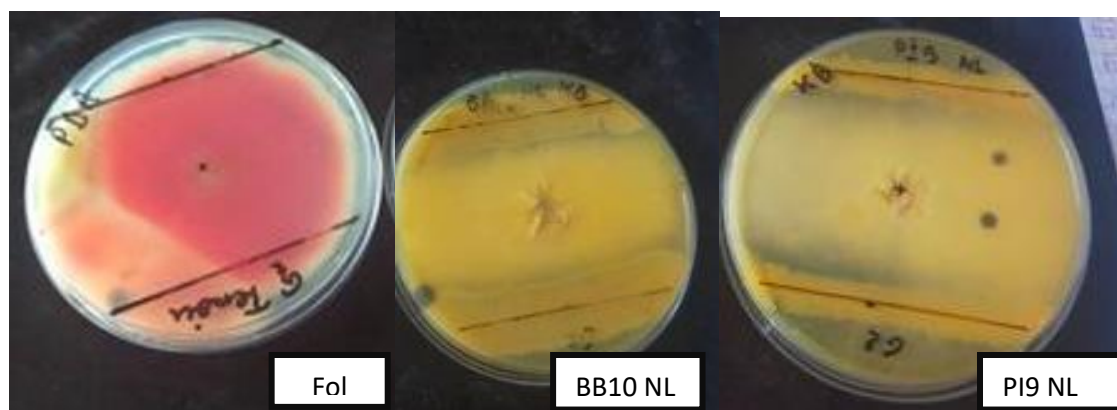


Figure 32: Activité antagoniste de la souche BB10 et PI9 non lyophilisées vis-à-vis Fol sur milieu KB.

➤ Sur Milieu Mixte

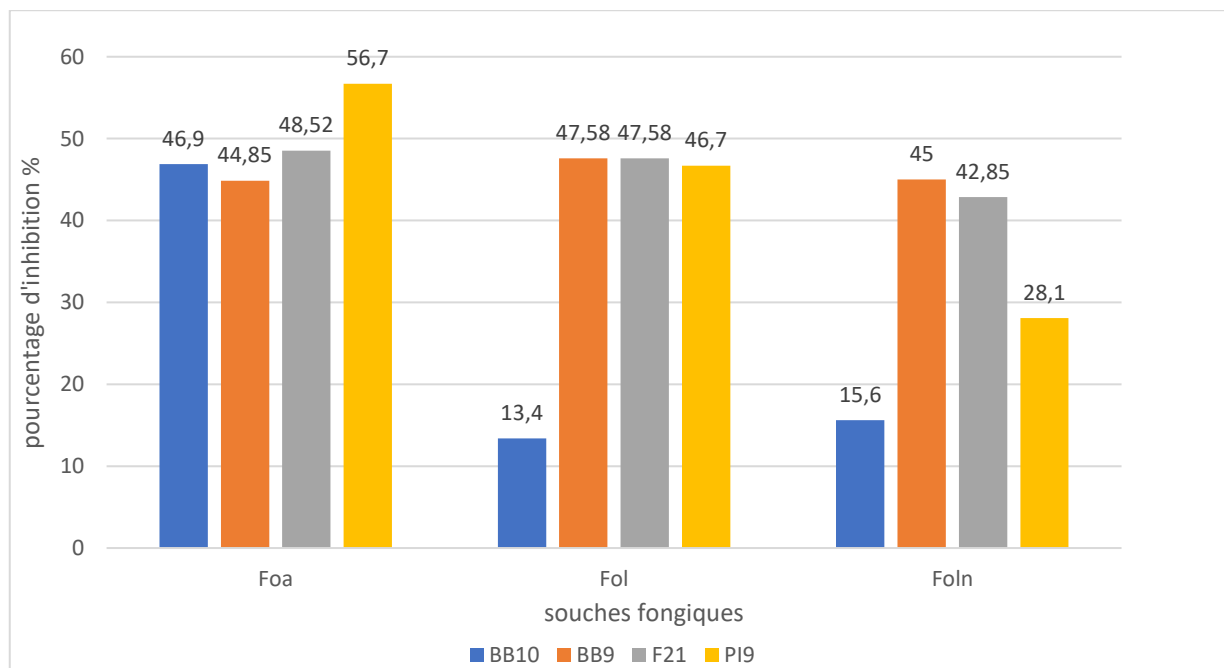


Figure 33 : Le taux d'activité antagoniste des quatre souches *Pseudomonas* spp fluorescent lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de *Fusarium* sur milieu mixte.

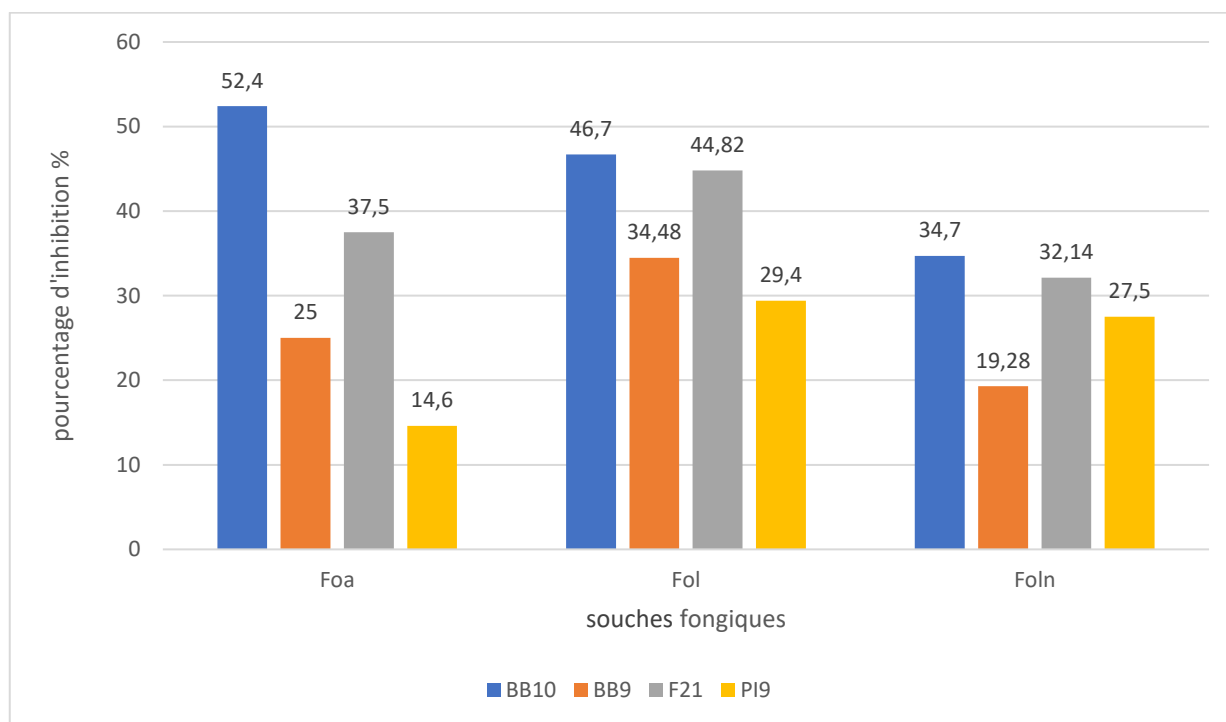


Figure 34 : Le taux d'activité antagoniste des quatre souches *Pseudomonas* spp fluorescent non lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de *Fusarium* sur milieu mixte.

Les résultats de l'inhibition de la croissance des trois formes spéciales de l'agent pathogène *Fusarium* sur milieu mixte illustré par les figures (34) montrent que le taux d'inhibition maximal a été noté avec lyophilisat PI9 vis-à-vis Foa (56.7%). Le taux le plus faible a été obtenu avec lyophilisat BB10 vis-à-vis Fol avec un taux d'inhibition (13.4%) , La croissance mycélienne de l'agent pathogène en confrontation avec les quatre souches bactériennes non lyophilisées correspond à des taux d'inhibition importante ,La souche bactérienne BB10 à présenter le pourcentage d'inhibition le plus élevé vis-à-vis la souche fongique Foa avec un taux de 52.4% par contre la souche bactérienne PI9 à le taux le plus bas avec 14.6% en confrontation avec la même souche fongique.

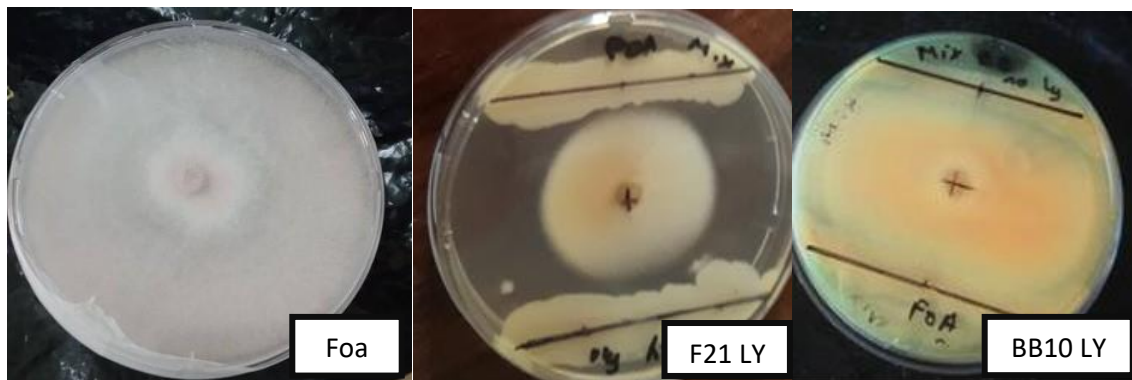


Figure 35 : Activité antagoniste de la souche BB10 ET F21 lyophilisées vis-à-vis Foa sur milieu mixte.

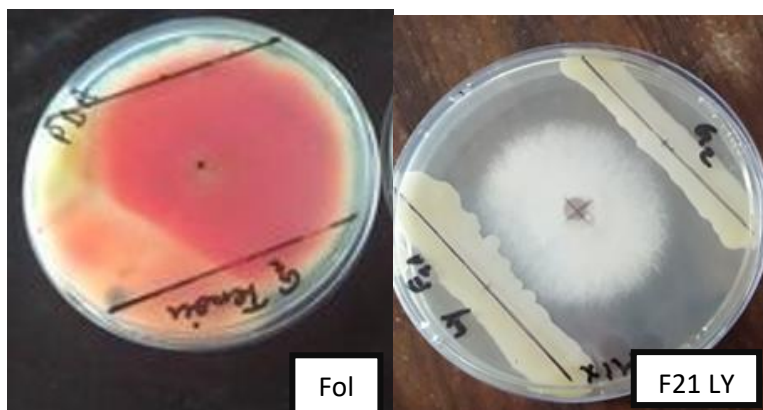


Figure 36 : Activité antagoniste de la souche F21 lyophilisées vis-à-vis Fol sur milieu mixte.



Figure 37 : Activité antagoniste de la souche BB9 non lyophilisées vis-à-vis Foa sur milieu mixte

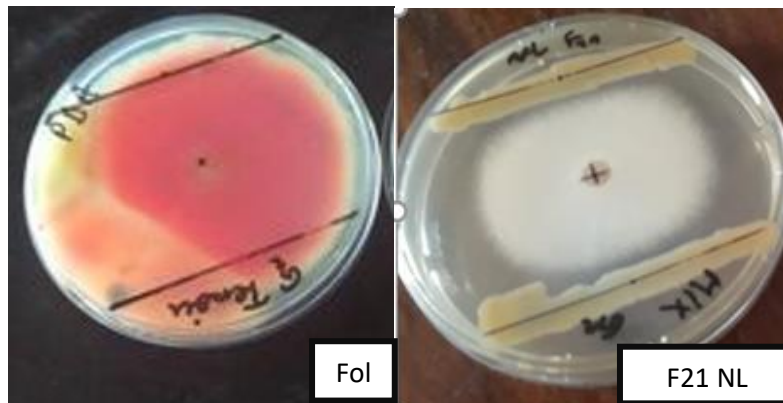


Figure 38 : Activité antagoniste de la souche F21 non lyophilisées vis-à-vis Fol sur milieu mixte

Les résultats obtenus sur l'effet antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp fluorescent vis-à-vis des trois souches de *Fusarium oxysporum*, reflètent clairement que les quatre souches testées ont la capacité inhérente à induire des effets antagonistes sur la croissance du mycélium et par conséquent sur la prolifération des trois champignons.

Les bactéries Gram+ résistent mieux à la lyophilisation, comme les bactéries lactiques (Castro et al., 1995; Selmer-Olsen et al., 1999; Nanasombat et al., 2007), tandis que leurs homologues Gram-, notamment *Pseudomonas* et *Escherichia coli*, sont très sensible à toute forme de séchage, surtout en l'absence de composés protecteurs (Louis et al., 1994; Palmfeldt et al., 2003). Cette différence de résistance au séchage entre les bactéries Gram+ et Gram- est principalement due à la composition de leur paroi cellulaire. Les travaux réalisés par (Palmfeldt et al., 2003 ; Stephan et al., 2007) ont montré que le fait de récolter les cellules après la phase stationnaire leur permettait de s'adapter aux conditions de stress et d'améliorer leur viabilité après le séchage, tandis que (Jørgensen et al., 1994) ont confirmé qu'il était essentiel pour la survie de *P. fluorescens* que la teneur en eau soit comprise entre 0,2 et 0,4. Ces techniques de séchage entraînent des dommages à la membrane cellulaire, comme une peroxydation lipidique, une dénaturation des protéines et de l'ADN conduisant à une perte de viabilité (Zhao et al., 2005) Les bactéries séchées sont exposées aux différentes réactions d'oxydation au cours de leur conservation. Les composants cellulaires les plus exposés pendant le séchage et la conservation de *P. fluorescens* sont: la membrane plasmique, les acides gras polyinsaturés, les protéines et le glutathion (Mputu et al., 2012a ; Mputu et al., 2012).

L'activité antagoniste des souches lyophilisées est moins importante par rapport aux souches non lyophilisées. Ceci est dû probablement à l'effet de la lyophilisation sur les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents ou une mutation.

L'activité antagoniste dépend non seulement des espèces et les souches testées, mais aussi de la composition du milieu de culture (**Digat, 1992**). Le milieu de culture influence sur l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents. Les souches bactériennes appauvrissent le milieu de culture et inhibent ainsi la croissance du champignon (**Jamalizadeh et al., 2008**)

La variabilité dans l'expression de l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents dans les trois milieux de culture suggère une diversité dans les mécanismes impliqués dans le biocontrôle (**Benchabane, 2005**).

Nos résultats ont révélé également des activités antagonistes chez les souches appliquées dans les milieux PDA et mixte. Ces résultats suggèrent que l'activité antagoniste exhibée par les différentes souches sur les deux milieux, n'est pas due à l'action des sidérophores, car les deux milieux ne favorisent pas la production des pigments fluorescents. Nous pouvons attribuer l'activité antagoniste exercée à la production d'autres métabolites secondaires.

III.3 Activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp fluorescent lyophilisées et non lyophilisées vis-à-vis bactérie phytopathogènes EHH3

Tableau 7 : l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp fluorescent lyophilisées et non lyophilisées vis-à-vis bactérie phytopathogènes EHH3

Les souches		Moyenne R 1 (cm)	Moyenne R2 (cm)	Moyenne Général (cm)
BB10	LY	1.5	0.66	1.08
	NL	1.6	2.13	1.86
BB9	LY	1.36	1	1.18
	NL	1.1	1.33	1.21
PI9	LY	2.66	2.3	2.48
	NL	2.6	2.58	2.58
F21	LY	1.13	1.1	1.11
	NL	1.06	1.2	1.13

Toutes les souches bactériennes étudiées montrent des interactions d'antagonisme avec la bactérie phytopathogène EHH3 avec des zones d'inhibition différentes varient entre 0.66 cm à 2.66cm. La moyenne générale des zones d'inhibition est réciproque, la plus basse est présente chez la souche BB10 lyophilisée avec 1.08 cm et la plus élevée est chez PI9 non lyophilisée avec 2.58 cm.

L'activité antagonistes des souches étudiées de *Pseudomonas* spp fluorescents non lyophilisées vis-à-vis la bactérie phytopathogène est plus importantes par rapport aux souches lyophilisées ce qui indique que la lyophilisation a un impact sur l'expression de l'activité antagoniste.

Pseudomonas spp fluorescents a toujours joué un rôle important dans le développement des biopesticides et des biofertilisants depuis l'existence de systèmes de production agricoles plus durables par la production d'agents inhibiteurs quelques soit leurs nature (antibiotiques, antifongique, sidérophores) Cependant, par rapport au volume de recherche qui a été effectué avec ces bactéries, peu de souches ont été développées avec succès en produits commerciaux pour le biocontrôle et la biostimulation des plantes (**Yanes et Bajsa,2016**). L'état de la culture bactérienne soit lyophilisée ou fraîche influence sur les niveaux d'inhibition (**Benoussaid,2019**).

Des biopesticides bactériens ont été produits dans des formulations sèches, ainsi que dans des concentrés liquides pour répondre à des besoins spécifiques du marché (**Jackson,2017**). La procédure consiste à stabiliser la viabilité des cellules dans une suspension en phase liquide maintenue sous réfrigération ou congelée en présence de substances cryoprotectrices, ou sous forme de produit déshydraté (**Montesinos et Bonaterra,2017**) . Il existe plusieurs procédures de séchage de microorganismes adoptés à l'échelle industrielle, y compris la lyophilisation, la fluidisation (**Coulibaly et al.,2011**), l'atomisation (**Geller et al.,2011**).

CONCLUSION

La pratique la plus fiable pour lutter contre les agents phytopathogènes et en baissant l'emploi de produits chimiques et le risques qui atteignent l'homme et son environnement est la lutte biologique. Car elle permet une protection à long terme de la culture par l'emploi d'organismes vivants, parmi ces derniers les PGPR plus précisément les *Pseudomonas* spp fluorescents

Notre objectif est de confirmé la viabilité des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents lyophilisées et conservées a 4c° pendant 10 ans par méthode de dénombrement directe et l'identification précise est nécessaire, ainsi que la vérification de la synthèse de quelques types de métabolites secondaires et par la suite leur activité antagoniste *in vitro* vis-à-vis trois forme de l'espèce fongique *Fusarium oxysporum* comparativement avec des études précédentes .

A travers notre étude il ressort : Le dénombrement direct sur boîte de Pétrie montre que la viabilité des quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent a légèrement augmentée chez la souche F21 et BB9 et a diminué chez BB10 et PI9 en comparant nos résultats avec celles de l'étude précédente .

Les quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent testées ont présenté une bonne production des métabolites secondaires qui rentrent dans la phytostimulation et le biocontrôle des agents phytopathogènes

L'étude de l'activité inhibitrices sur les trois milieux de culture PDA, KB et mixte, montre que les souches testées sont dotées d'une bonne activité antagoniste vis-à-vis les trois isolats fongiques en enregistrant des taux d'inhibition de la croissance mycéliennes différentes allant jusqu'à 72.5% par la souche F21.

L'utilisation des composés protecteurs (glycérol et maltodextrine) avant la lyophilisation ont permis de maintenir une viabilité peu remarquable à la fin de la lyophilisation et au cours du stockage de *Pseudomonas* spp. fluorescent.

Le choix et la variation dans les composés protecteurs appropriés sont très importants pour assurer une viabilité élevée des bactéries pendant la lyophilisation et au cours du stockage. Les souches lyophilisées utilisées présentent des potentialités antagonistes importantes et une grande capacité à produire une large gamme de métabolites secondaires. Cependant, la lyophilisation apparait la technique la plus utilisées en dépit de son cout pour le séchage et la

conservation des bactéries en général et *Pseudomonas* spp en particulier car elle est adaptée pour les souches sensibles à des températures élevées. De plus, elle permet d'obtenir une déshydratation poussée compatible avec des durées de conservation très longues et une manipulation plus facile. La connaissance de certains paramètres responsables de la perte de viabilité de *Pseudomonas* spp. fluorescents pendant leur lyophilisation et au cours de leur stockage permettra de résoudre le problème lié à leur conservation. Dans le souci d'optimiser la conservation de la poudre lyophilisée de *P. fluorescens*, certaines techniques et voies de recherches doivent être explorées. Nous retenons, parmi elles, l'étude des températures appropriées dans la phase de congélation au cours de la lyophilisation de *Pseudomonas* spp. Fluorescents et l'amélioration du rendement de la production de *Pseudomonas fluorescens* en mimant sur les différents milieux de culture et des composés protecteurs.

Perspectives

Pour résoudre le problème lié à la conservation des *Pseudomonas* spp fluorescent, il faut :

- Etude des paramètres d'optimisation (températures appropriées dans la phase de congélation au cours de la lyophilisation, les milieux de cultures correspondants, le choix du cryoprotecteurs utilisée).
- La poursuite de l'étude sur ces souches pour confirmer les résultats obtenus *in vitro* par leur applications *in situ*.
- Il est souhaitable d'utiliser d'autres méthodes qui permettent la précision dans la viabilité des bactéries telles que la cytométrie de flux qui permet la détermination de l'état physiologique cellulaire (cellules viables, cellules mortes et cellules viables mais non cultivables).

Référence bibliographique

Adela M.Lujan Pedro Gomez et Angus Buckling « *Siderophore cooperation of the bacterium *Pseudomonas fluorescens* in soil* », *Biology Letters*, vol. 11, 1^{er} février 2015, p. 20140934 (ISSN 1744-9561 et 1744-957X, PMID 25694506, PMCID 4360104, DOI 10.1098/rsbl.2014.0934, lire en ligne [archive], consulté le 17 octobre 2015)

Ahemad, M. & Khan, M.S. (2011). Insecticide-tolerant and plant growth promoting Bradyrhizobium sp. (vigna) improves the growth and yield of greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] in insecticide-stressed soils. *Symbiosis* 54(1): 17-27.

Ahemad, M. & Khan, M.S. (2011). Response of greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] grown in herbicide-amended soil to quizalafop-ethyl and clodinafop tolerant plant growth promoting Bradyrhizobium sp. (vigna) MRM6 *J. Agric. Sci. Technol* 13: 1209-1222.

Ahemad, M. & Kibret, M. (2013). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University-Science* 26(01): 1

Almeida LA, Araujo R. 2013. Highlights on molecular identification of closely related species. *Infect. Genet. Evol.* 13:67–75. 10.1016/j.meegid.2012.08.011

Alonso S., 2016 - *Novel Preservation Techniques for Microbial Cultures*, pp. 7-33 In : Ojha K.S. et Tiwari K. B., *Novel Food Fermentation Technologies*

Andreani NA, Martino ME, Fasolato L, Carraro L, Montemurro F, Mioni R, Bordin P, Cardazzo B. 2014. Suivi du bleu : une approche MLST pour caractériser le

Anita B. & Samiyappan R., 2012. Induction of systemic resistance in rice by *Pseudomonas fluorescens* against rice root knot nematode *Meloidogyne graminicola*. *J. Biopesticides*, 5, 53-59.

Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H. 2000. Affiliation phylogénétique des pseudomonades basée sur la séquence d'ARNr 16S. *Int. J. Syst. Évol. Microbiol.* 50:1563–1589. 10.1099/00207713-50-4-1563

Arora N. K., Khare E. et Maheshwari D. K., 2010. Plant growth promoting rhizobacteria: constraints in bioformulation, commercialization, and future strategies. *Plant growth and health promoting bacteria*, Springer: 97-116.

Référence bibliographique

Askeland A. T and Morrison M.(1983). Cyanide Production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 45, No. 6.

Bánki, O., Roskov, Y., Vandepitte, L., DeWalt, R. E., Remsen, D., Schalk, P., Orrell, T., Keping, M., Miller, J., Aalbu, R., Adlard, R., Adriaenssens, E., Aedo, C., Aesch, E., Akkari, N., Alonso-Zarazaga, M. A., Alvarez, B., Alvarez, F., Anderson, G., et al. (2021). Catalogue of Life Checklist (Version 2021-10-18). Catalogue of Life. <https://doi.org/10.48580/d4t2>, consulté le 30 mai 2013

-Bánki, O., Roskov, Y., Vandepitte, L., DeWalt, R. E., Remsen, D., Schalk, P., Orrell, T., Keping, M., Miller, J., Aalbu, R., Adlard, R., Adriaenssens, E., Aedo, C., Aesch, E., Akkari, N., Alonso-Zarazaga, M. A., Alvarez, B., Alvarez, F., Anderson, G., et al. (2021). Catalogue of Life Checklist (Version 2021-10-18). Catalogue of Life. <https://doi.org/10.48580/d4t2>, consulté le 28 juillet 2014..

Bais H. P., Weir T. L., Perry L. G., Gilroy S., Vivanco J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57 233–266

Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F. et Obert J. P., 2008- *Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques.* In: Corrieu G. et Luquet F.-M. *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments.* pp. 661-785.

Becker, D., R. Stanke, I. Fendrik, W.B. Frommer, J. Vanderleyden, W.M. Kaiser et R Hedrich., (2002). Expression of the NH₄⁺ transporter gene LEAMT1; 2 is induced in tomato roots upon association with N₂-fixing bacteria. *Planta*, 215: 424-429

Benchabane, M., (2005). Caractérisation des effets d'antagonisme microbien et de promotion de la croissance végétale de souche de *Pseudomonas* spp. fluorescents, Thèse de Doctorat d'Etat, FSB-UTHB, Alger, 235p.

Beneduzi, A. Ambrosini, A. & Passaglia, Luciane M.P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet Mol Biol*, 35(4 Suppl): 1044-1051

Benoussaid.N.,2019-Etude de quelques caractères phénotypiques et génotypiques du métabolisme secondaire lié au biocontrôle et la phytostimulation chez les *Pseudomonas* spp fluorescents ., *Microbiologie*, Université Saad Dahlab Blida ;242p.

Référence bibliographique

Blumer, C. and Haas, D., 2000. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol.* 173: 170-177.

Bric, J. M., Bostock, R. M. and Silverstone, S. E., (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 535–538.

Berendsen R. L., Pieterse C. M. J, Bakker P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* 17 478–486

Berninger T., González López Ó., Bejarano A., Preininger C. et Sessitsch, A., 2017-Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants. *Microbial Biotechnology*, vol.11(2), pp. 277-301.

Cabrefiga J., Francés J., Montesinos E. et Bonaterra A., 2011- Improvement of fitness and efficacy of a fire blight biocontrol agent via nutritional enhancement combined with osmoadaptation. *Appl Environ Microbiol* , vol. 77, pp. 3174-3181

Cappuccino, J.C et N Sherman. (1992). Microbiology :A Laboratory Manual, third ed. Benjamin/cummings pub. Co, New York, pp.125-179.

Carvalho A. S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F. X. et Gibbs P., 2004- Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, vol.14 , pp.835-847

Castro H.P., Teixeira P.M. & Kirby R., 1995. Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,44,172-176.

Chapalain A, Rossignol G, Lesouhaitier O, Merieau A, Gruffaz C, Guerillon J, Meyer JM, Orange N, Feuilloy MG. 2008. Comparative study of 7 fluorescent pseudomonad clinical isolates. *Can. J. Microbiol.* 54:19–27. 10.1139/W07-110

Chouvenc P., Vessot S., Andrieu J. et Vacus P., 2004. Optimization of the freeze-drying cycle: a new model for pressure rise analysis. *Drying Technology*, 22(7): 1577- 1601.

Cornelis P, Matthijs S, Van Oeffelen L. 2009. Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals* 22:15–22. 10.1007/s10534-008-9193-0

Cornelis P. 2010. Absorption et métabolisme du fer chez les pseudomonades. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86:1637–1645. 10.1007/s00253-010-2550-2

Référence bibliographique

Coulibaly I., Yao A.A., Lognay G. & Fauconnier M.-L., 2009. Survival of freeze-dried of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* related to their cellular fatty acids composition during storage. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **157**, 70-84.

Coulibaly I., Dubois-Dauphin R., Danthine S., Majad L., Mejoub T., Destain J., Béra F., Wathelet J. P. et Thonart P., 2011- Techniques de séchage des starters lactiques et mécanismes affectant la viabilité cellulaire suite à la lyophilisation. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, vol. 15, pp. 287-299.

Czarnes S, Hallett PD, Bengough AG, Young IM. Root-and microbial-derived mucilages affect soil structure and water transport. Eur. J. Soil Sci. 2000 ;51(3):435–443

Dastager, S.G., C.K. Deepa et A. Pandey (2010) .Potential plant growth promoting activity of *Serratia nematophila* NII-0.928 on black papper (*Piper nigrum* L.). *World J.Microbiol. Biotechnol.*, **27**: 259-265.

De Beer D., Sauter E., Niemann H., Kaul N., Foucher J. P., Witte U., Schlüter M. et BoetiusA., 2006. In situ fluxes and zonation of microbial activity in surface sediments of the Håkon Mosby Mud Volcano. *Limnology and Oceanography*, **51(3)**: 1315-1331

Demirhan E. & Özbek B., 2010. Drying kinetics and effective moisture diffusivity of purslane undergoing microwave heat treatment. *Korean J. Chem. Eng.*, **27**, 1377-1383.

Devanesan M.G., Viruthagiri T. & Sugumar N., 2007. Transesterification of *Jatropha* oil using immobilized *Pseudomonas fluorescens*. *Afr. J. Biotechnol.*, **6**, 2497-2501.

Digat B. (1994). Les bactéries stimulatrices de la croissance des plantes : le cas des *Pseudomonas*. *C.R.Acad .Agric. fr.* **80** : 125- 140. .

Donnarumma G, Buommino E, Fusco A, Paoletti I, Auricchio L, Tufano MA. 2010. Effect of temperature on the shift of *Pseudomonas fluorescens* from an environmental microorganism to a potential human pathogen. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **23**:227–234

Ellis, R.J., Timms-Wilson, T.M., Bailey., M.J., 2000. Identification of conserved traits in fluorescent pseudomonads with antifungal activity. *Environemental microbiology*. Volume 2, Issue 3 : 274–284

Référence bibliographique

Enderby B, Smith D, Carroll W, Lenney W. 2009. Hydrogen cyanide as a biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the breath of children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **44**:142–147. 10.1002/ppul.20963

Enoch, D. A., Simpson, A. J., & Kibbler, C. C. (2004). Predictive value of isolating *Pseudomonas aeruginosa* from aerobic and anaerobic blood culture bottles. *Journal of Medical Microbiology*, *53*(Pt 11), 1151-1154.

Euzeby,JP. List of prokaryotic names with standing in nomenclature Genus Pseudomonas. 2014.

Fredrickson J. K., Li S. W., Gaidamakova E. K., Matrosova V. Y., Zhai M., Sulloway H.M., Scholten J. C., Brown M. G., Balkwill D. L. et Daly M. J., 2008- Protein oxidation: key to bacterial desiccation resistance?. *The ISME Journal*, vol, 2, pp. 393-403.

Freeman, L. R. Angelini, P. Silverman, G. J. and C. Merritt, JR.(1975). Production of Hydrogen Cyanide by *Pseudomonas fluorescens*. *American Society for Microbiology*. Vol. 29, No. 4.

Frydenlund Michelsen C et Stougaard P. (2012). Hydrogen cyanide synthesis and antifungal activity of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* In5 from Greenland is highly dependent on growth medium. *Canadian Journal of Microbiology*

Forlani, G., Pastorelli, R., Branzoni, M. and Favilli, F., (1995). Root colonization efficiency, plant growth promoting activity and potentially related properties in plant associated bacteria. *J. Gen. Breeding*, *49*: 343–352.

Gao G. et al., 2012. Effect of biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2P24 on soil fungal community in cucumber rhizosphere using T-RFLP and DGGE. *PlosOne*, **7**, e31806, doi:10.1371/journal.pone.0031806.

Garbeva P. V., Van Elsas J. D, Van Veen J. A. (2008). Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant Soil* *302* 19–32

García A. H., 2011-Anhydrobiosis in bacteria: from physiology to applications. *Journal of Biosciences*, vol. 36, pp. 939-950.

García Lucas, J.A., Schloter, M., Durkaya, T., Hartmann, A. & Gutierrez-Maero, F.J. (2003). Colonization of pepper roots by a plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* strain. *Biol Fertil Soils* *37*(6): 381-385.

Référence bibliographique

Gautam,S.P.,Bundela , P.S.,Pandery ,A.K.,Jamaluddin., Awasthi , M.K.,Sarsaiy,S.(2010).Cellulase production by *Pseudomonas* SP .Isolated from municipal solid waste compost . *Int.J.Aca.Res.*2(6):330-333.

Gauthier V. D. (2013). Inhibition du pathogène des salmonidés *Saprolegnia parasitica* par des bactéries aquatiques. Université de Montréal. Mémoire du grade de Maître ès sciences (M.Sc.).

Gennari M, Dragotto F. 1992. A study of the incidence of different fluorescent *Pseudomonas* species and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and fish, raw milk, cheese, soil and water. *J. Appl. Bacteriol.* **72**:281–288. 10.1111/j.1365-2672.1992.tb01836.x

Glick, B.R. (2012). *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications* Hindawi Publishing Corporation, Scientifica vol 2012. Article ID963401, 15p.

Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. 2007. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**:81–91. 10.1099/ijs.0.64483-0

Greffe V. R. G. et Michiels J., 2020- Desiccation-induced cell damage in bacteria and therelevance for inoculant production. *Applied Microbiology and Biotechnology.*104, 3757-3770

Gross H, Loper JE. 2009. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat. Prod. Rep.* **26**:1408–1446. 10.1039/b817075b

Haas, D. and Defago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(4):307-319.

Han, J., Sun, L., Dong, X., Cai, Z., Xiaolu, S., Yang, H. et al. (2005). Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Syst Appl Microbiol* 28(1): 66-76

Harrison A.P. & Pelczar M.J., 1963. Damage and survival of bacteria during freeze-drying and during storage over a ten-year period. *J. Gen. Microbiol.*, **30**, 395-400.

Hartmann A., Schmid M., Van Tuinen D., Berg G. (2009). Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* 321 235–257

Référence bibliographique

Henry D, Speert D. Pseudomonas. In: **Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D, editors. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. Washington DC: ASM press; 2011. p. 677-91.**

Hernandez, M. E., Kappler, A., and Newman, D. K. (2004) Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. *Appl Environ Microbiol* **70**: 921– 928.

Hirsch P. R., Mauchline T. H. (2012). Who's who in the plant root microbiome ? *Nat. Biotechnol.* **30** 961–962

Hohnadel D, Meyer JM. 1988. Specificity of pyoverdine-mediated iron uptake among fluorescent *Pseudomonas* strains. *J. Bacteriol.* **170**:4865–4873

Howell C, Stipanovic R. 1980. Suppression de la fonte des semis induite par *Pythium ultimum* sur les semis de coton par *Pseudomonas fluorescens* et son antibiotique, la pyolutéorine. *Phytopathologie* **70** : 712–715. 10.1094/Phyto-70-712

Inceoglu O., Van Overbeek L. S., Salles J. F, Van Elsas J. D. (2013). The normal operating range of bacterial communities in soil used for potato cropping. *Appl. Environ. Microbiol.* **79** 1160–1170

Jamalizadeh M, Etebarien HR, Alizadeh A et Aminian H. (2008). Biological control of gray mould on apple fruits by *Bacillus licheniformis* (EN 74-1). *phytoparastica.* **36**, 23-29.

Jørgensen F., Nybroe O. & Knøchel S., 1994. Effect of starvation and osmotic stress on viability and heat resistance of *Pseudomonas fluorescens* AH9. *J. Appl. Microbiol.*, **77**, 340-347.

Johnston A. & Booth C. (1983). *Plant Pathologist's Pocketbook.* 2nd Ed. Kew, Commonwealth Mycological Institute. 120p.

Joseph, B., R. Ranjan Patra et R. Lawrence., (2007). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Plant Prod.* **1**: 141- 152

Kalaiarasi K. and Sunitha P. U.(2009). Optimization of alkaline protease production from *Pseudomonas fluorescens* isolated from meat waste contaminated soil. Department of Textiles and Clothing, Avinashilingam University for Women, Coimbatore 641 043, Tamil Nadu, India. *African Journal of Biotechnology* Vol. **8** (24), pp. 7035-7041.

Référence bibliographique

Kawahara H., 2008 - *Cryoprotectants and Ice-Binding Proteins*, pp. 229-246 In: Margesin R., Schinner F., Marx J. C. et Gerday C., *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology*.

Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., & Zingernagel, R. M. (Eds.). (2001). *Medical Microbiology* (10th ed.). Stuttgart, Germany : Georg Thieme Verlag.

Khannous L, Jrad M, Dammak M, Miladi R, Chaaben N, Khemakhem B, Gharsallah N and Fendri I. (2014) Isolation of a novel amylase and lipase-producing *Pseudomonas luteola* strain: study of amylase production conditions. *Lipids in Health and Disease*, 13:9

Kim J. & Rees D.C. (1994). Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry* 33(2): 389-97.

King EO, Ward MK, Raney DE. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301–307

Kirk J. L., Klironomos J. N., Lee H., Trevors J. T. (2005). The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environ. Pollut.* 133 455–465

Kloepper, J.W. & Schroth, M.N. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. Dans *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Vol. 2. Institut national de la recherche agronomique (INRA), Angers, France. pp. 879-882

Koka R. and Weimer B.C.(2000). Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98. Utah State University, *Journal of Applied Microbiology*, 89, 280-288

Konstantinidis KT, Ramette A, Tiedje JM. 2006. Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7286–7293. 10.1128/AEM.01398-06

koskiniemi,S.(2010). Dynamic of Bacterial Genom: Rate and Mechanisme of Mutation. UPPSALA University.1651-6206.

Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. 2004. Le rôle de la pyocyanine dans l'infection à *Pseudomonas aeruginosa*. *Tendances Mol. Méd.* 10:599–606. 10.1016/j.molmed.2004.10.002

Référence bibliographique

Laursen JB, Nielsen J. 2004. Produits naturels de phénazine : biosynthèse, analogues synthétiques et activité biologique. *Chim. Rév.* 104 : 1663–1686. 10.1021/cr020473j

Lemanceau A., Robin S. and Mazurier G. Vansuyt. Implication of Pyoverdines in the Interactions of Fluorescent Pseudomonads with Soil Microflora and Plant in the Rhizosphere. *Soil Biology.* 12 (2007): 166. https://doi.org/10.1007/978-3-540-71160-5_8

Lemanceau, P., (1992). Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas spp.* fluorescent. *Agronomie. revue* 12 ,413-437.

Leslie S. B., Israeli E., Lighthart B., Crowe J. H. et Crowe L. M., 1995- Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol.61, 3592-3597.

LeTourneau, M. K., Marshall, M. J., Cliff, J. B., Bonsall, R. F., Dohnalkova, A. C., Mavrodi, D. V., et al. (2018) Phenazine-1-carboxylic acid and soil moisture influence biofilm development and turnover of rhizobacterial biomass on wheat root surfaces. *Environ Microbiol* **20**: 2178– 2194

Leveau J. H. J. (2007). The magic and menace of metagenomics: prospects for the study of plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119 279–300

Li J. et al., 2004. Fluidized-bed drying of biological materials: two cases studies. *Chin. J. Chem. Eng.*, **12**, 840-842.

Lievens L. C. et van't Riet K., 1994- Convective drying of bacteria. Factors influencing survival. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol.51, pp. 71-89.

Loper JE, Hassan KA, Mavrodi DV, Davis EW, 2nd, Lim CK, Shaffer BT, Elbourne LD, Stockwell VO, Hartney SL, Breakwell K, Henkels MD, Tetu SG, Rangel LI, Kidarsa TA, Wilson NL, van de Mortel JE, Song C, Blumhagen R, Radune D, Hostetler JB, Brinkac LM, Durkin AS, Kluepfel DA, Wechter WP, Anderson AJ, Kim YC, Pierson LS, 3rd, Pierson EA, Lindow SE, Kobayashi DY, Raaijmakers JM, Weller DM, Thomashow LS, Allen AE, Paulsen IT. 2012. Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas spp.*: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genet.* **8**:e1002784. 10.1371/journal.pgen.1002784

Référence bibliographique

Louis P., Trüper H.G. & Galinski E.A., 1994. Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,41,684-688

Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541e556.

Maddula, V. K., Zhang, Z., Pierson, E., and Pierson, L., III. (2006) Quorum sensing and phenazines are involved in biofilm formation by *Pseudomonas chlororaphis (aureofaciens)* strain 30-84. *Microb Ecol* 52: 289– 301

Mavrodi DV, Blankenfeldt W, Thomashow LS. 2006. Composés de phénazine dans les *Pseudomonas* spp. biosynthèse et régulation. *Annu. Rév. Phytopathol.* 44:417–445. 10.1146/annurev.phyto.44.013106.145710

Mazereeuw-Hautier J., 2006. Formation médicale continue : impétigo. *Ann. Dermatologie Vénérologie*, 133, 194-207.

Mercado-Blanco J, van der Drift KM, Olsson PE, Thomas-Oates JE, van Loon LC, Bakker PA. 2001. Analysis of the pmsCEAB gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *J. Bacteriol.* 183:1909–1920. 10.1128/JB.183.6.1909-1920.2001
Meyer JM, Geoffroy VA, Baida N, Gardan L, Izard D, Lemanceau P, et al. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:2745-53.

Meyer JM, Geoffroy VA, Baida N, Gardan L, Izard D, Lemanceau P, et al. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:2745-53.

Mézaache, S.A., Haichour, N., Guechi, A. & Zerroug, M. (2016). Bacteriocins Contributing in Rhizospheric Competition among Fluorescent *Pseudomonas*. *Annual Research & Review in Biology* 11(4): 1-9.

Miethling R., Wieland G., Backhaus H., Tebbe C. C. (2000). Variation in microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microb. Ecol.* 40 43–56

Référence bibliographie

Migula, W. (1894). Über ein neues System der Bakterien. Arbeiten aus dem bakteriologischen Institut der technischen Hochschule zu Karlsruhe, 1235-238.

Miraza, M S., W. Ahmed, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand et KA. Malik (2001). Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micropropagated sugarcane in vitro. *Plant Soil*, 237:47–54

Miyamoto-Shinohara Y., Sukenobe J., Imaizumi T. et Nakahara T., 2008- Survival of freeze-dried bacteria. *The Journal of general and applied microbiology*, vol. 54, pp. 9-24.

Moneke A.N., Okpala G.N. & Anyanwu C.U., 2010. Biodegradation of glyphosate herbicide *in vitro* using bacterial isolates from four rice fields. *Afr. J. Biotechnol.*, **9**, 4067-4074.

Mor A, et al. Singlet oxygen signatures are detected independent of light or chloroplasts in response to multiple stresses. *Plant Physiol.* 2014 ;165(1):249–261

Moore ERB, Tindall BJ, Dos Santos VAPM, Pieper DH, Ramos JL, Palleron NJ. 2006. Non médical : Pseudomonas, p 646–703 Dans Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E. (ed), *Prokaryotes : un manuel sur la biologie des bactéries*, vol 6, 3e éd. Springer, New York, État de New York

Morgan C. A., Herman N., White P. A. et Vesey G., 2006- Preservation of microorganisms by drying; a review. *J Microbiol Methods*, vol.66, pp. 183–193

Morrison, C. K. Arseneault, T . Novinscak, A and Filion, M. (2017). Phenazine-1 Carboxylic Acid Production by *Pseudomonas fluorescens* LBUM636 Alters *Phytophthora infestans* Growth and Late Blight Development. *American phytopathological society*. Vol 107, N o 3. pp 273-279

Mputu Kanyinda J.-N., Pierart C., Destain J., Noki P. et Thonart P., 2014- Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens* (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. Vol. 18(1), pp. 134-141.

Mputu Kanyinda J.-N., Pierart C., Weekers F., Delvigne F., Destain J., Wathelet J.-P. et Thonart P., 2012a- Effects of glycerol on *Pseudomonas fluorescens* BTP1 freeze-dried. *Int. J. Biotechnol. Biochem.*, vol. 8, pp. 245-258.

Référence bibliographique

Mputu Kanyinda J.-N., Pierart C., Weekers F., Destain J. et Thonart P., 2012b- Impact of protective compounds on the viability, physiological state and lipid degradation of freeze-dried *Pseudomonas fluorescens* BTP1 during storage. *Int. J. Biotechnol. Biochem.*, vol. 8, pp. 17-26.

Mulet M, Lalucat J, Garcia-Valdes E. 2010. Analyse basée sur la séquence d'ADN de l'espèce *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol.* 12:1513–1530. 10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x

Najafi M.H.B ; Pezeshki P. (2013). Bacterial mutation ; types, mechanisms and mutation detection methods: a review. *European Scientific Journal.* vol. 4 . ISSN: 1857 – 7881.

Nanasombat S.& Sriwong N.,2007.Improving viability of freeze-dried lactic acid bacteria using lyoprotectants in combination with osmotic and cold adaptation. *KMITL Sci. Technol. J.*,7,61-67

Neal A. L., Ahmad S., Gordon-Weeks R., Ton J. (2012). Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere

Neilands JB. 1981. Absorption et transport du fer dans les micro-organismes. *Annu. Rév. Nutr.* 1:27–46. 10.1146/annurev.nu.01.070181.00033

Neilands. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. J. Biol. Chem. vol. 270 (45) (1995): 26723–26726.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26723>

Ngumbi, E., Klopper, J. (2016). Bacterial-mediated drought tolerance: Current and future prospects. *Applied Soil Ecology* 105(2016): 109-125.

Niranjan Raj, S., Deepak, S. A., Basavaraju, P., Shetty, H. S., Reddy, M. S., & Klopper, J. W. (2003). Comparative performance of formulations of plant growth promoting rhizobacteria in growth promotion and suppression of downy mildew in pearl millet. *Crop Protection*, 22, 579e588.

Oberhansli T, G. Défago. , Haas, D. (1991). Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHAO of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. *Journal of General Microbiology* (1991), 137, 2273-2279

Référence bibliographique

Ongena M. et al., 2005. Isolation of an N-alkylated benzylamine derivative from *Pseudomonas putida* BTP1 as elicitor of induced systemic resistance in bean. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **18**, 562-569.

Parray J., A., Jan S., Kamili A.,N., Qadri R., A., et al. (2015). Current Perspectives on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *J Plant Growth Regul* 121 : 325-334.

Palmfeldt J., Radström P. & Hahn-Hägerdal B., 2003. Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. *Cryobiology*, **47**, 21-29

Palleroni NJ. 2008. The road to the taxonomy of *Pseudomonas*, p 1–18 *In* Cornelis P. (ed), *Pseudomonas. Genomics and molecular biology*. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom

Palleroni NJ. 2010. L'histoire de *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol.* **12**:1377–1383. 10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x
Paradis-Bleau, C. (2003). Développement accéléré de nouveaux inhibiteurs contre les protéines de division cellulaire FtsZ et FtsA de *Pseudomonas*

Palumbo, S. A. (1972). Role of iron and sulfur in pigment and slime formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **111**(2), 430-436.

Parejko, J A. Mavrodi, D V. Mavrodi, O V. Weller, David M. and Thomashow L S. (2013). Taxonomy and Distribution of Phenazine-Producing *Pseudomonas* spp. in the Dryland Agroecosystem of the Inland Pacific Northwest, United States. Ncbi. “<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> “Consulter 12/06/2018.

Park J.Y.Oh. S.A., Anderson A.J, Neiswender J, Kim J.-C. and Kim Y.C.(2010). Production of the antifungal compounds phenazine and pyrrolnitrin from *Pseudomonas chlororaphis* O6 is differentially regulated by glucose. Chonnam National University, Gwangju, Korea. *Applied Microbiology* ISSN 0266-8254

Peix A, Ramirez-Bahena MH, Velazquez E. 2009. Évolution historique et état actuel de la taxonomie du genre *Pseudomonas*. *Infecter. Genet. Évol.* **9**:1132–1147. 10.1016/j.meegid.2009.08.001

Perneel, M. Heyrman, J. Adiobo, A. De Maeyer, Raaijmakers, K. J.M. De Vos² and P. Hofte M.(2006). Characterization of CMR5c and CMR12a, novel fluorescent

Référence bibliographique

Pseudomonas strains from the cocoyam rhizosphere with biocontrol activity. Laboratory of Phytopathology ;Ghent University. Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072.

Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L. and Robaglia, C., (2003). Tales from the underground: molecular plant–rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.* 26: 189–199.

Pitt TL, Simpson AJ. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia* spp. In: Hawkey PM, Gillespie SH, editors. Principles and Practice of Clinical Bacteriology. Chichester: John Wiley and Sons; 2006. p. 426-43.

Rajmohan, S. Dodd C.E.R. and Waites W.M. (2002). Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. University of Nottingham, Journal of Applied Microbiology, 93, 205–213

Ramette A, Moenne-Loccoz Y, Defago G. 2003. Prévalence des pseudomonades fluorescentes produisant des phloroglucinols antifongiques et/ou du cyanure d'hydrogène dans les sols naturellement suppressifs ou propices à la pourriture noire des racines du tabac. *Microbiol FEMS. Écol.* 44:35–43. 10.1111/j.1574-6941.2003.tb01088.x33. Gross H, Loper JE. 2009. Génomique de la production de métabolites secondaires par *Pseudomonas* spp. *Nat. Prod. Rép.* 26:1408–1446. 10.1039/b817075b

Ramette A, Moenne-Loccoz Y, Defago G. 2003. Prévalence des pseudomonades fluorescentes produisant des phloroglucinols antifongiques et/ou du cyanure d'hydrogène dans les sols naturellement suppressifs ou propices à la pourriture noire des racines du tabac. *Microbiol FEMS. Écol.* 44:35–43. 10.1111/j.1574-6941.2003.tb01088.x

Redondo-Nieto M, Barret M, Morrissey JP, Germaine K, Martinez-Granero F, Barahona E, Navazo A, Sanchez-Contreras M, Moynihan JA, Giddens SR, Coppoolse ER, Muriel C, Stiekema WJ, Rainey PB, Dowling D, O'Gara F, Martin M, Rivilla R. 2012. Genome sequence of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Bacteriol.* 194:1273–1274. 10.1128/JB.06601-11

Reetha A.K, Pavani S.L and S.Mohan. (2014). Hydrogen Cyanide Production Ability by bacterial antagonist and their Antibiotics Inhibition Potential on *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* ISSN: 2319- 7706 Vol 3, No 5, pp. 172-178.

Référence bibliographique

Renshaw J., Robson G., Trinci A., Wiebe M., Livens F., Collison D. And Taylor R., Fungal Siderophores: Structures, Functions and Applications. Mycological Research, 106 (10) (2002) 1123-1142

Rezzonico F, Binder C, Defago G, Moenne-Loccoz Y. 2005. Le système de sécrétion de type III du biocontrôle *Pseudomonas fluorescens* KD cible le phytopathogène Chromista *Pythium ultimum* et favorise la protection du concombre. *Mol. Plante Microbe Interact.* 18:991–1001. 10.1094/MPMI-18-0991

Rubin, R.L., Groenigen, K.J.V. & Hungate, B.H. (2017). Plant growth promoting rhizobacteria are more effective under drought: a meta-analysis. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, AZ 86011, USA, pp. 15

Saharan BS. et V. Nehra (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, Volume 2011: LSMR-21

Salmond GP, Reeves PJ. 1993. Membrane traffic wardens and protein secretion in gram-negative bacteria. *Trends Biochem. Sci.* 18:7–12. 10.1016/0968-0004(93)90080-7

Sandhya, V., S.K.Z. Ali, B. Venkateswarlu, G. Reddy, et M. Grover. (2010). Effect of osmotic stress on plant growth promoting *Pseudomonas* spp. *Arch. Microbiol.* 192: 867-876

Santivarangkna C., Wenning M., Foerst P. et Kulozik U., 2007-Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *J. Appl. Microbiol.*, vol. 102, pp. 748-756.

Sarniguet A, Kraus J, Henkels MD, Muehlchen AM, Loper JE. 1995. Le facteur sigma sigma affecte la production d'antibiotiques et l'activité de contrôle biologique de *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:12255–12259. 10.1073/pnas.92.26.12255 [Article PMC gratuit] [PubMed] [CrossRef]

Schisler D. A., Slininger P. J. et Olsen N. L., 2016- Appraisal of selected osmoprotectants and carriers for formulating Gram-negative biocontrol agents active against *Fusarium* dry rot on potatoes in storage. *Biological Control*, vol.98, pp. 1-10..

Schnider U, Keel C, Blumer C, Troxler J, Defago G, Haas D. 1995. L'amplification du facteur sigma d'entretien ménager chez *Pseudomonas fluorescens* CHA0 améliore la

Référence bibliographique

production d'antibiotiques et améliore les capacités de biocontrôle. *J. Bactériol.* 177:5387–5392 [Article PMC gratuit] [PubMed]

Schuch, P., Bouhallaba S., Duruptb, D., Vareilleb, P., Humbertb, J.P. et Marin, M. (2004). Séchage des lactosérum et dérivés : rôle du lactose et de la dynamique de l'eau. *Lait.* 84, 243-268

Selmer-Olsen E., Birkeland S.-E. & Sorhaug T., 1999. Effect of protective solutes on leakage from and survival of immobilized *Lactobacillus* subjected to drying, storage and rehydration. *J. Appl. Microbiol.*, 87, 429- 437

Siddiqui I A., Shaukat, S., Hussain Sheikh I and Khan A.(2005). Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. Soil Biology and Ecology Laboratory, Department of Botany, University of Karachi, 75270, Karachi, Pakistan.

Silby MW, Cerdeno-Tarraga AM, Vernikos GS, Giddens SR, Jackson RW, Preston GM, Zhang XX, Moon CD, Gehrig SM, Godfrey SA, Knight CG, Malone JG, Robinson Z, Spiers AJ, Harris S, Challis GL, Yaxley AM, Harris D, Seeger K, Murphy L, Rutter S, Squares R, Quail MA, Saunders E, Mavromatis K, Brettin TS, Bentley SD, Hothersall J, Stephens E, Thomas CM, Parkhill J, Levy SB, Rainey PB, Thomson NR. 2009. Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biol.* 10:R51. 10.1186/gb-2009-10-5-r51

Silby M.W., Winstanley C., Godfrey S.A.C., Levy S.B. et Jackson R.W., 2011- *Pseudomonas* genomes : diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews* , Vol.35(4), pp.652-680

Smalla K., Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J., Kaiser S., et al. (2001). Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 4742–4751

Smibert, R.M. and Krieg, N.R., (1994). Phenotypic characterization. In: Methods for general and molecular bacteriology. P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg (ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp.607–654

Référence bibliographique

Sood, C. R., S. V. Chanda et Y. D. Singh. , (2002). Effect of different nitrogen sources and plant growth regulators on glutamine synthetase activities of radish cotyledons. *Bulg. J. Plant Physiol.*, 28: 46-56.

Sorensen J., Hauberg Nicolaisen M., Ron E., Simonet P. (2009). Molecular tools in rhizosphere microbiology – from single-cell to whole-community analysis. *Plant Soil* 321 483–512

Sperandio D, Decoin V, Latour X, Mijouin L, Hillion M, Feuilloley MG, Orange N, Merieau A. 2012. Virulence de la souche clinique MFN1032 de *Pseudomonas fluorescens* envers *Dictyostelium discoideum* et les macrophages en relation avec le système de sécrétion de type III. *BMC Microbiol.* 12:223. 10.1186/1471-2180-12-223

Stanier, R.Y, Palleroni, N.J. and Doudoroff, M., (1966). The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43: 159-271.

Stephan D., Bisutti L.L., Matos da Silva A.-P. & Covi J., 2007. Optimisation of the freeze-drying process of *Pseudomonas fluorescens* strains Pf 153 and CHA0. *IOBC WPRS Bull.*,30,511-515

Sunder Alariya S, Sethi S, Gupta S and Gupta B. (2013). Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil. *Archives of Applied Science Research*, 5 (1):15-24

Thomashow L.S and Weller M.D. (1988). Role of a Phenazine Antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in Biological Control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Washington State University. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Vol. 170, No. 8, P. 3499-3508

Thomas F. C. Chin-A-Woeng, Guido V. Bloemberg and Ben J. J. Lugtenberg. (2002). Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. Institute of Molecular Plant Sciences, Leiden University, The Netherlands. *New Phytologist* 157: 503–523

Trögl J. et al., (2012). *Pseudomonas fluorescens* HK44: lessons learned from a model wholecell bioreporter with a broad application history. *Sensors*, 12, 1544-1571.

UdeS Arnold D. L Moon C. D Timms-wilson T Spiers A. J Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental Pseudomonas isolates. Environ Microbiol 2006 81119972011

Référence bibliographique

Vacheron, J., Desbrosses, G & Bouffaud, M.L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D. et al. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning, *Front Plant Sci.* 4(356): 1-19.

Valverde C, Heeb S, Keel C, Haas D. 2003. RsmY, un petit ARN régulateur, est nécessaire de concert avec RsmZ pour l'expression dépendante de GacA des traits de biocontrôle chez *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Microbiol.* 50:1361–1379. 10.1046/j.1365-2958.2003.03774.x

Van Passel MW, Kuramae EE, Luyf AC, Bart A, Boekhout T. 2006. The reach of the genome signature in prokaryotes. *BMC Evol. Biol.* 6:84. 10.1186/1471-2148-6-84

Vinoth Raj S., Kanikkay Raja A., Manoj G. Tyagi, Naman Hirenkumar Shah, Johnson Amala Justin N.A, Infant Santhos B, and sathiyaseelan K, (2009). Study of starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the production of amylase by using paddy straw. *Recent research in science and technology* 1(1): 008-013

Vincent, Edith; Shackleton, Nicholas J; Hall, Michael A (1991): Stable oxygen and carbon isotope composition of Miocene planktonic foraminifers from the tropical Indian Ocean. *PANGAEA*

Walker T. S., Bais H. P., Grotewold E., Vivanco J. M. (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* 132 44–51.

Watford S and Warrington J.S. (2017). Bacterial DNA Mutations. NCBI.

Willcox, M. D. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* infection and inflammation during contact lens wear : a review. *Optometry and Vision Science : Official Publication of the American Academy of Optometry*, 84(4), 273-278. doi : 10.1097/OPX.0b013e3180439c3e

Wuest WM, Sattely ES, Walsh CT. 2009. Three siderophores from one bacterial enzymatic assembly line. *J. Am. Chem. Soc.* 131:5056–5057. 10.1021/ja900815w

Yamamoto S, Kasai H, Arnold DL, Jackson RW, Vivian A, Harayama S. 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* 146:2385–2394

Youard ZA, Mislin GL, Majcherczyk PA, Schalk IJ, Reimann C. 2007. *Pseudomonas fluorescens* CHA0 produces enantio-pyochelin, the optical antipode of the *Pseudomonas*

Référence bibliographique

aeruginosa siderophore pyochelin. *J. Biol. Chem.* **282**:35546–35553.
10.1074/jbc.M707039200

Zhao G. & Zhang G., 2005. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.*, **99**, 333-338.

Zhengyu Huang Robert F. Bonsall Dmitri V. Mavrodi David M. WellerLinda S. Thomashow. (2004). Transformation of *Pseudomonas fluorescens* with genes for biosynthesis of phenazine-1-carboxylic acid improves biocontrol of rhizoctonia root rot and in situ antibiotic production. *FEMS Microbiology Ecology*, Vol 49, 2, 1, pp 243–251

Annexe 1

Tableau : matériel non biologiques utilisée

Matériel du laboratoire	
Verreries	Appareillages
Becher	Vortex
Erlen Meyer	Balance
Ballon	Agitateur magnétique
Entonnoir	Plaque chauffante
Pipette graduée	Bec benzine
Poire	Autoclave
Eprouvette	Incubateur
Tubes a essai	/

Annexe 2

Tableau 1 : dénombrement direct sur un milieu solide

	10^{-4}		10^{-7}		10^{-9}		10^{-11}	
BB10	190		80	139	/	/	/	/
BB9	116	202	60	50	/	//	/	/
PI9	208	/	199	/	/	/	/	/
F21	124	147	45	17	339	/	240	/

Tableau 2 : la moyenne de trois répétitions issus de dénombrement

	10^{-4}	10^{-7}	10^{-9}	10^{-11}
BB10	$1.9 \cdot 10^7$	$7.9 \cdot 10^9$	/	/
BB9	$1.59 \cdot 10^7$	$5.50 \cdot 10^9$	/	/
F21	$1.35 \cdot 10^7$	$3.1 \cdot 10^9$	/	/
PI9	$2.08 \cdot 10^7$	$1.99 \cdot 10^{10}$	/	/

Annexe 3

Préparation des milieux de culture

Tous les milieux ont été stérilisés à l'autoclave pendant 20 min à 120°, ensuite ils sont placés à une température ambiante pour leur refroidissement afin de faciliter leur manipulation et éviter les condensations.

Le milieu Gélose au Lait (GL)

Composant	Quantité
Peptone de soja	5g
Extrait de levure	2.5g
Agar	12.5g
Glucose	1g
Lait écrémé	1g
Eau distillé stérile	1L

Le milieu Nutrient Broth Yeast extract (NBY)

Composants	Quantité
Bouillon nutritif	8g
K ₂ HPO ₄	2g
Extrait de levure	2g
KH ₂ PO ₄	0.5g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0.25g
Glucose	2g
Agar	15g
Eau distillée stérile	1 litre

Le milieu gélose + amidon

Composants	Quantité
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2.5g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	1.25g
Amidon	2g
Agar	15g
Eau distillé stérile	1 litre

Réactif picrate de sodium

Composant	Quantité
Acide picrique	5 ml dans 100 ml d'EDS
Carbonate de sodium	2 g dans 100 ml d'EDS

Le milieu Tryptophane- Soya- Agar (TSA)

Composant	quantité
Peptone de caséine	17 g
Peptone de farine de soja	3 g
Glucose	2.5 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate dipotassique	2.5 g
Glycine	4.4 g/l
Eau distillée stérile	1 L

Réactif de salkowski

Composant	Quantité
Fe ₃ Cl ₃ (0.5M)	2%
Acide perchlorique	35%

Le milieu Lauria Bertain (LB)

Composant	Quantité
Bactotryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Agar	5 g
Tryptophane	5 g
Eau désilée stérile	1 L

Le milieu Pikovskaya (PVK)

Composant	Quantité
Glucose	10 g
Phosphate bicalcique	5 g
Extrait de levure	0.5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.1 g
Agar	17 g
MnSO ₄	Trace
FeSO ₄	Trace
KCL	0.2 g
Bleu bromophénol	4 ml
Eau distillée stérile	1 L

Milieu Gélose nutritif (GN)

Composant	Quantité
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2.5g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	1.25g
Agar	15g
Eau distillé stérile	1 litre

Milieu KING B (KB)

Composant	Quantité
Peptone	20 g
Agar	20 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
MgSO ₄ ,7H ₂ O	1.5 g
Glycérol	15 ml
Eau distillé stérile	1L

Milieu Potato-Dextrose- Agar (PDA)

Composant	Quantité
Pomme de terre	250 g
Dextrose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée stérile	1 L

Milieu mixte (50% PDA + 50% KB)

Composant	quantité
Pomme de terre	125 g
Dextrose	10 g
Peptone	10 g
Agar	10 g
K ₂ HPO ₄	0.75 g
MgSO ₄ ,7H ₂ O	0.75 g
Glycérol	7.5 ml
Eau distillé stérile	1L

Milieu Carboxy- Méthyl Cellulose (CMC)

Composant	Quantité
Peptone	10 g
Carboxymethyl cellulose	10 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Agar	12 g

MgSO ₄	0.3 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
Eau distillé stérile	1 L

Annexe 4

Tableau : Résultat de confrontation des souches de *Pseudomonas* spp. Fluorescent lyophilisées vis-à-vis les trois souches de *Fusarium oxysporum*.

BB10		FOA		G2		G7		
BB10	KB	Diamètre de pathogène (cm)	6	7	8	8	2.5	4.7
		PI (%)	20.7		0		55	
		Ecart type	0.70		0		1.55	
	PDA	Diamètre de pathogène (cm)	5	4.7	7.5	6	5	4
		PI (%)	40.8		13.4		43.7	
		Ecart type	0.21		1.60		0.70	
	MIX	Diamètre de pathogène (cm)	4	4.7	7.5	6	7.5	6
		PI (%)	46.9		13.4		15.6	
		Ecart type	0.49		1.60		1.60	
BB9	KB	Diamètre de pathogène (cm)	3.8	4.3	4	4.3	4	4.3
		PI (%)	40.44		0.21		0.21	
		Ecart type	0.35		0.21		0.21	
	PDA	Diamètre de pathogène (cm)	3.8	3.7	4.3	5	3.9	4.5
		PI (%)	44.85		35.86		40	
		Ecart type	0.07		0.49		0.42	
	MIX	Diamètre de pathogène (cm)	3.5	4	3.6	4	3.7	4
		PI (%)	44.85		47.58		45	
		Ecart type	0.35		0.28		0.21	
PI9	KB	Diamètre de pathogène (cm)	2	2.6	2	2.4	2.4	2
		PI (%)	71.9		71.7		72.5	
		Ecart type	0.42		0.28		0.28	
	PDA	Diamètre de pathogène (cm)	5.3	5.7	7.5	7.6	5.7	6.5
		PI (%)	32.9		3.2		23.7	

		Ecart type	0.28		0.07		0.56	
	MIX	Diamètre de pathogène (cm)	3.7	3.4	4	4.3	6.5	5
		PI (%)	56.7		46.7		28.1	
		Ecart type	0.21		0.21		1.06	
F21			FOA		G2		G7	
	KB	Diamètre de pathogène (cm)	3	2.9	3.5	4.3	3.6	3.9
		PI (%)	56.61		46.20		46.42	
		Ecart type	0.07		0.56		0.21	
	PDA	Diamètre de pathogène (cm)	3.7	4.6	5.5	5.5	5.2	4.3
		PI (%)	38.97		24.13		32.14	
		Ecart type	0.63		0		0.63.	
	MIX	Diamètre de pathogène (cm)	3.5	3.5	4	3.6	4	4
		PI (%)	48.52		47.58		42.85	
		Ecart type	0		0.28		0	

Tableau : Résultat de confrontation des souches de *Pseudomonas* spp. Fluorescent non lyophilisées vis-à-vis les trois souches de *Fusarium oxysporum*.

NL			FOA		G2		G7	
BB10	KB	Diamètre de pathogène (cm)	3.8	3.2	3.6	4.3	3.4	4
		PI (%)	57.3		49.3		53.7	
		Ecart type	0.42		0.49		0.42	
	PDA	Diamètre de pathogène (cm)	6	5	7.5	6.5	6.5	7
		PI (%)	32.9		3.8		18.7	
		Ecart type	0.70		0.70		0.35	
	MIX	Diamètre de pathogène (cm)	4	3.8	4	4.3	5	5.5
		PI (%)	52.4		46.7		34.7	
		Ecart type	0.14		0.21		0.35	
BB9	KB	Diamètre de pathogène (cm)	4	4	3.5	3.6	4.1	4.4

		PI (%)	41.17		51.03		39.28		
		Ecart type	0		0.07		0.21		
		PDA	Diamètre de pathogène (cm)	4.3	4.6	3.8	3.8	4.3	4.6
			PI (%)	36.15		47.58		36.42	
			Ecart type	0.21		0		0.21	
			MIX	Diamètre de pathogène (cm)	5	5.2	4.6	4.9	5.5
	PI9		PI (%)	25		34.48		19.28	
			Ecart type	0.14		0.21		0.21	
			KB	Diamètre de pathogène (cm)	4.5	3.8	4.5	3.4	5
			PI (%)	49.3		49.3		45.6	
			Ecart type	0.49		0.77		0.91	
			PDA	Diamètre de pathogène (cm)	5.2	5.5	7.5	7.4	5.7
			PI (%)	34.7		4.4		31.2	
			Ecart type	0.21		0.07		0.21	
			MIX	Diamètre de pathogène (cm)	6.3	7	4.5	6.5	5.6
F21		PI (%)	14.6		29.4		27.5		
		Ecart type	0.49		1.41		0.28		
		KB	Diamètre de pathogène (cm)	4	3.5	3.6	4	3.5	4
			PI (%)	44.85		47.58		46.42	
			Ecart type	0.35		0.28		0.35	
			PDA	Diamètre de pathogène (cm)	3.1	3.8	4.6	4.1	3.2
			PI (%)	49.26		40		52.14	
			Ecart type	0.49		0.35		0.21.	
			MIX	Diamètre de pathogène (cm)	4	4.5	4	4	4.5
		PI (%)	37.5		44.82		32.14		
		Ecart type	0.35		0		0.35		