

UNIVERSITE SAAD DAHLAB BLIDA

**Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire
Laboratoire de Protection et Valorisation des Ressources Agrobiologiques
(LPVRAB)**

THESE DE DOCTORAT

En Biologie

Spécialité : Microbiologie

**ETUDE DE QUELQUES CARACTERES PHENOTYPIQUES ET
GENOTYPIQUES DU METABOLISME SECONDAIRE LIE AU
BIOCONTROLE ET LA PHYTOSTIMULATION CHEZ LES
Pseudomonas spp. FLUORESCENTS.**

Par :

Nacéra BENOUSSAID

Devant le jury composé de :

Dj. GUITARNI	Professeur, USD Blida 1	Président
S.A SNOUSSI	Professeur, USD Blida 1	Examineur
Y. KACI	Professeur, USTHB Bab Ezzouar- Alger	Examineur
M. MEFTI	Maître de conférences, ENSA - El Harrach	Examineur
M. BENCHABANE	Professeur, USD Blida 1	Directeur de thèse
Ph. THONART	Professeur, U. Gembloux, Belgique	Co-directeur de thèse

Décembre 2018

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	
RÉSUMÉ.....	
LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES ABREVIATIONS.....	
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	5
I.1. Introduction au genre Pseudomonas	5
I.2. Evolution de la taxonomie du genre Pseudomonas.....	6
I.3. Les Pseudomonas spp. fluorescents	8
I.3.1 Les Pseudomonas spp. fluorescents Phytobénéfiques.....	8
I.3.2. Métabolites secondaires phytobénéfiques	12
I.3.3. Quorum sensing (QS) et métabolisme secondaire.....	23
I.4. Bioformulations microbiennes phytobénéfiques	25
I.4.1 Marché des biopesticides.....	26
I.4.2. Limites des biopesticides	27
1.4.3. Conception de bioformulations microbiennes	28
CHAPITRE II. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE PSEUDOMONAS SPP. FLUORESCENTS.	33
II.1. Introduction	33
II.2. Matériel et Méthodes	34
II-2.1. Echantillons de sol	34
. II-2.2. Isolement des souches bactériennes.....	34
II-2.3. Identification taxonomique	35
II.2.4. Sélection et caractérisation des souches	38
II .3. Résultats	44
II.3.1. Isolement des souches de Pseudomonas spp. fluorescents.....	44
II-3.2. Identification spécifique.....	45
II-3.3. Identification infraspécifique.....	46
II.3.4. Distribution des souches selon les biotopes.....	47
II.3.5. Essai d'antagonisme in vitro.....	48

II.3.4. Caractérisation des profils trophiques (BIOLOG).....	50
II.3.5. Séquençage de l'ADNr 16S et étude phylogénétique	52
II.4. DISCUSSION	56
CHAPITRE III : MÉTABOLITES SECONDAIRES	62
III.1. Introduction	62
III.2. Matériel et Méthodes	63
III.2.1. Matériel biologique	63
III.2.2. Production de siderophores	63
III.2.3. Production de l'acide indole acétique (AIA).....	63
III.2.4. Phosphatases	64
III.2.5. Pectinases.....	64
III.2.6. Lipases.....	64
III.2.7. Protéases	64
III.2.8. Chitinases	65
III.2.9. Cellulases.....	65
III.2.10. Amylases.....	65
III.2.11. Production de NH ₃	65
III.2.12. Production de cyanure d'hydrogène (HCN).....	65
III.2.13. Production de Phénazines (PHZ).....	66
III.3 Résultats	71
III.3.1. Métabolites secondaires	71
III.3. Discussion	82
CHAPITRE IV : FORMULATION DE RHIZOBACTÉRIES PAR LYOPHILISATION	90
IV.1. Introduction	90
IV.2. Matériel et méthodes	91
IV.2.1. Test de résistance à la température	91
IV.2.2. Analyse des acides gras par Chromatographie gaz - liquide	91
IV.2.3. Procédé de formulation.....	92
IV.2.4. Viabilité des bactéries	92
IV.3. Résultats.....	93
IV.3.2. Analyse des acides gras cellulaires (AGC)	94
IV.3.3. Viabilité des lyophilisats bactériens	95
IV.3. Discussion.....	100

CHAPITRE V : BIOCONTRÔLE DE LA FUSARIOSE VASCULAIRE DE LA TOMATE	108
V.1. Introduction	108
V.2. Matériel et méthodes	110
V.2.1. Agent phytopathogène.....	110
V.2.2. Inoculats bactériennes	110
V.2.3. Matériel végétal	111
V.2.4. Sol	112
V.2.5. Antagonisme in vitro	112
V.2.6. Antagonisme in situ.....	113
V.2.9. Paramètres de croissance	118
V.2.10. Analyse statistique.....	119
V.3 Résultats.....	119
V.3.1. Antagonisme in vitro	119
V.3.2. Test de pathogénicité	120
V.3.3. Biocontrôle de la fusariose vasculaire de la tomate.....	120
V.3.4. Observation microscopique	126
V.3.5 Colonisation rhizosphérique.....	128
V.3.6 Phytostimulation	128
V.4. Discussion.....	130
DISCUSSION GÉNÉRALE	141
CONCLUSION GÉNÉRALE	147
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	151
ANNEXES	185

Remerciements

Cette thèse est une œuvre collective et sa réalisation n'aurait pas été possible sans la générosité, l'hospitalité et le support de plusieurs personnes qui ont contribué à sa réalisation. C'est avec une profonde gratitude que je les remercie...

J'adresse mes plus sincères et chaleureux remerciements à mon Directeur de thèse, Monsieur le Professeur **Messaoud BENCHABANE**, sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour. Je lui suis également reconnaissante pour sa disponibilité même dans les périodes difficiles, ses qualités humaines, pédagogiques et scientifiques. Sa présence, son écoute et ses conseils avisés m'ont énormément aidé à m'affirmer et à évoluer en tant que chercheur. Je lui adresse ici toute ma reconnaissance et mon admiration. Il me faudrait rédiger tout un manuscrit de thèse supplémentaire pour dresser le bilan de tout ce que vous m'avez apporté tant sur le plan scientifique en termes de rigueurs, efficacité et concepts généraux que personnel.

Mes vifs remerciements vont également à mon co-directeur de thèse, Monsieur le Professeur **Philippe THONART** professeur à l'Université de Liège - ulg- Gembloux Agro-Bio Tech, qui a rendu possible la réalisation de cette thèse; pour l'accueil chaleureux qu'il m'a réservé au sein de son équipe et de mettre à jour mes connaissances dans le domaine. J'ai apprécié sa disponibilité, l'autonomie et la confiance qu'il m'a accordées; un grand merci pour son aide scientifique et ses orientations.

Mes remerciements et mon profond respect vont à Monsieur **DJ. GUITARNI**, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (département de Biologie) de l'Université Blida 1, d'avoir accepté la charge de présider le jury de cette thèse. Je tiens également à exprimer mes vifs remerciements et ma gratitude aux membres du jury pour la confiance qu'ils m'ont témoigné et l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail : Monsieur **S. A.SNOUSSI**, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (département de Biotechnologies) de l'Université Blida 1, Monsieur **Y.KACI** Professeur à l'USTHB Bab Ezzouar- Alger et Monsieur **M.MEFTI** , Maître de conférences à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach à Alger.

Ce fut un privilège de travailler dans un cadre aussi chaleureux et propice au travail en équipe que l'a été le Laboratoire de Protection et Valorisation des Ressources Agrobiologiques (**LPVRAB**). Un grand merci à toute l'équipe : Professeur **BENCHABANE.M** qui m'a permis d'intégrer le laboratoire, Professeur **BELKAHLA.H**, Professeur **KRIMI.Z**, **Mme TOUA.D** et aux ingénieurs du laboratoire particulièrement **Djamila** et **Samia**.

Une thèse, tant nominative soit elle, est avant tout un travail de réflexion collectif et c'est avec un grand plaisir que je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé, sous ma direction, à ce travail : **BOUMAHDI.Z**, **OTSMANE .Z**, **LEHLALI.M**, **IZRI.H**, **MIRAD.S**, **SOUABER.M**, **ZARZOUR.I**, **CHARFA.R** et **BELRAMOUL.N** (Masters).

Je tiens à remercier particulièrement le personnel du secrétariat du CWBI, que je nomme affectueusement la « tour de contrôle du CWBI », **Marina CHANET**, **Marguerite DEMI** et **Cécile EK** et pour leur accueil chaleureux, leur disponibilité et surtout leur bonne humeur qui n'a jamais fait défaut tout au long de mes séjours à Gembloux.

Je tiens à remercier les doctorants avec lesquels j'ai passé ces journées au CWBI à l'unité de Bio-industries de Gembloux: **Annick LE JEUNE** et Jean Noel pour leur marque de sympathie et leur contribution dans la réalisation de la partie d'identification moléculaire et la lyophilisation.

Mes remerciements aux personnels de la station expérimentale de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Université Blida 1.

Je ne pourrai oublier d'adresser mes remerciements aux amis : **BENCHABANE .D**, **MOHAMED MAHMOUD .F**, **BOUCHERIT.A**, **BERRAF-TEBBAL**, **MANSOURI.W**, **TEMMAR.M**, **DRIASSA.N**.

Un grand merci aux collègues et amis - enseignants de la faculté des Sciences de la nature et de la Vie de Blida plus spécialement du département de Biologie pour leur soutien pendant les années d'études et pour tous les excellents souvenirs.

Comment peut-on oublier mon époux **Hocine** pour son soutien sans faille, sa grande indulgence, sa compréhension et surtout sa contribution dans le partage du stress de la recherche. Je suis heureuse de partager cette thèse avec lui.

Merci enfin à tous ceux que j'aurais oublié de citer ici et qui normalement le mériteraient...

Ce travail je le dédie particulièrement à mes parents, à ma famille et ma belle-famille.

A ma Mère source d'affection, de compréhension et de patience,

A la mémoire de mon père,

Mes frères **HAMID et KARIM,**

Mes sœurs **OUARDIA, SAMIA, CECILE** et leurs enfants

Ma belle-sœur **MERIEM**

Ma nièce **DJAMILA**

Enfin à mes Enfants (**Chandelles**) :

YOUCEF RAMI ET ANES.

Résumé

Titre: Etude de quelques caractères phénotypiques et génotypiques du métabolisme secondaire lié au biocontrôle et la phytostimulation chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents.

L'exploration des échantillons de sols rhizosphériques, en provenance de divers environnements du sud Algérien (palmeraie, poirier, pommier et tomate), a permis de sélectionner plus de 100 isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Les espèces types de ce groupe: *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis* et *P. aureofaciens* ont été retrouvées avec la prédominance de la première espèce.

Les résultats de l'approche moléculaire (l'ARNr 16S) comparés avec les résultats phénotypiques (clé dichotomique et Biolog GENIII) révèlent la complexité et la forte hétérogénéité au niveau des différentes espèces du genre *Pseudomonas*. Le criblage, via les tests du pouvoir antagoniste, a dégagé 17 souches montrant de fortes activités antagonistes *in vitro* vis-à-vis de phytopathogènes bactériens et fongiques avec des taux d'inhibition allant jusqu'à 67,33 %.

Six souches ont pu croître à 45°C et produisent des métabolites impliqués dans le biocontrôle et la phytostimulation (protéases, chitinases, amylases, siderophores, HCN, AIA, phosphatase et ammoniac).

La recherche de composés phénaziniques, par CCM et HPLC, révèlent que les souches PI9 et F21 synthétisent l'acide-phénazine-carboxylique (PCA). La souche BB9 est suspectée productrice d'un autre composé phénazinique ou d'un dérivé de phénazines.

Le protocole de formulation, non optimisé, appliqué sur trois souches (BB10, BB9 et F21) a causé des pertes en viabilité après leur lyophilisation directe (0.39 % et 1.09 %). Les résultats de la cytométrie en flux ont permis une meilleure détermination de l'état physiologique cellulaire (cellules viables, cellules mortes et cellules viables mais non cultivables). L'addition de cryoprotecteurs (maltodextrine et glycérol), n'a pas réduit les pertes dues à la lyophilisation, mais a pu influencer, relativement, la stabilité des préparations microbiennes séchées lors du stockage (5 années) avec des taux de viabilité relativement variables (13.28 % et 25.21 %) enregistrés, respectivement, avec les souches BB9 et F21.

L'application de lyophilisats, avec et sans protecteurs, en comparaison avec les souches fraîchement cultivées assure une bioprotection des plants de tomate contre la fusariose vasculaire, en réduisant sensiblement les symptômes et sa sévérité où les taux d'inhibition sont parfois au-delà de 40 %. L'application des mêmes lyophilisats a induit des phytostimulations appréciables en hauteurs des plants, en phytomasse des parties aériennes et souterraines, ainsi que sur les teneurs en chlorophylle totale.

Mots clés: *Pseudomonas* spp fluorescents, identification, métabolites secondaires, lyophilisation, viabilité, stockage, biocontrôle, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi*.

Abstract

Title:

Study of some phenotypic and genotypic characters of secondary metabolism related to biocontrol and phytostimulation in *Pseudomonas* spp. fluorescent.

Exploration of rhizospheric soil samples from various environments in southern Algeria (palm, pear, apple and tomato), selected more than 100 isolates of *Pseudomonas* spp. fluorescent. The typical species of this group: *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis* and *P. aureofaciens* were found with the predominance of the first species.

The results of the molecular approach (16S rRNA) compared with the phenotypic results (dichotomous key and Biolog GENIII) reveal the complexity and the strong heterogeneity in the species of the genus *Pseudomonas*. Screening, through antagonism tests, revealed 17 strains showing strong antagonistic activity *in vitro* against bacterial and fungal phytopathogens, with inhibition rates of up to 67.33 %.

Six strains were able to grow at 45 ° C and produce metabolites involved in biocontrol and phytostimulation (proteases, chitinases, amylases, siderophores, HCN, AIA, phosphatase and ammonia).

The search for phenazine compounds, by TLC and HPLC, reveals that the PI9 and F21 strains synthesize the phenazine carboxylic acid (PCA). The BB9 strain is suspected to be a producer of another phenazine compound or a phenazine derivative.

The non-optimized formulation protocol applied to three strains (BB10, BB9 and F21) caused viability losses after direct lyophilization (0.39% and 1.09%). The results of the flow cytometry allowed a better determination of the cellular physiological state (viable cells, dead cells and viable cells but not cultivable). The addition of cryoprotectants (maltodextrin and glycerol) did not reduce losses due to lyophilization, but could relatively influence the stability of dried microbial preparations during storage (5 years) with relatively variable viability rates (13.28% and 25.21%) recorded, respectively, with strains BB9 and F21.

The application of lyophilisats, with and without protectors, in comparison with the freshly cultivated strains ensures a bioprotection of tomato plants against vascular fusariosis, significantly reducing the symptoms and its severity (40%). The application of the same lyophilisats induced appreciable phytostimulations in the heights of the plants, in phytomass of the aerial and underground parts, as well as in the total chlorophyll contents.

Key words: *Pseudomonas* spp fluorescentes, identification, secondary metabolites, lyophilization, viability, storage, biocontrol, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi*.

ملخص

العنوان: دراسة بعض الصفات المظهرية والجينومية للأبيض الثانوي المرتبط بالحيوية والتحفيز النباتي لدى *Pseudomonas spp. fluorescents*

قد تم اختيار عينات من التربة من مناطق مختلفة من الجنوب الجزائري (النخيل، الكمثرى، التفاح، والطماطم)، واختيرت أكثر من 100 عزلة من *Pseudomonas spp.* حيث تم العثور على الأنواع النموذجية لهذه المجموعة:

P. aureofaciens و *P. chlororaphis* ، *P. putida* ، *P. fluorescens* مع غلبة النوع الأول.

نتائج التحليل الجزيئي (rRNA16S) مقارنة مع النتائج المظهرية (ثنائية التفرع و Biolog GENIII) تكشف عن التعقيد و عدم التجانس القوي في الأنواع من جنس *Pseudomonas*.

أظهر الفحص ، من خلال اختبارات الخصومة ، 17 سلالة ذات نشاط مختبري عدواني فعال ضد البكتيريا والفطريات النباتية ، مع معدلات تثبيط تصل إلى 67.33%.

كانت ست سلالات قادرة على النمو عند 45 درجة مئوية وتنتج الأيضات في المكافحة الحيوية والتحفيز النباتي (البروتيناز ، الكيتيناز ، الأميلاز ، siderophores ، HCN ، AIA ، الفوسفاتيز والأمونيا)

البحث عن مركبات الفينازين ، عن طريق TLC و HPLC ، يكشف أن السلالات PI9 و F21 تنتج حمض الفينيل (PCA). phenazine carboxylic acid. ويشتهر في أن السلالة BB9 منتجة لمركب آخر من مركبات الفينازين أو مشتق من الفينازين.

تسبب بروتوكول الصياغة الغير المحسن المطبق على ثلاث سلالات (BB9 ، BB10 ، و F21) في فقدان القدرة على الحياة بعد التجفيف المباشر (0.39% و 1.09%). سمحت نتائج قياس التدفق الخلوي بتحديد أفضل للحالة الفسيولوجية الخلوية (خلايا قابلة للحياة ، وخلايا ميتة وخلايا قابلة للحياة ولكن غير قابلة للزراعة). لم تقلل إضافة المحفزات المتجمدة (maltodextrin و glycerol) من الخسائر بسبب التجفيف ، ولكن يمكن أن تؤثر نسبيا على استقرار المستحضرات الميكروبية المجففة أثناء التخزين (5 سنوات) مع معدلات جدوى متغيرة نسبياً (13.28% و 25.21%) على التوالي ، لدى السلالات BB9 و F21.

تطبيق lyophilisats ، مع وبدون حماية ، بالمقارنة مع السلالات المزروعة أنيا يضمن حماية بيولوجية bioprotection لنباتات الطماطم ضد fusariosis ، والحد بشكل كبير من الأعراض وشدتها (40%). أدى استخدام نفس المستحضرات lyophilisats الى تحث في النمو phytostimulations في أطوال النباتات ، في أوزان phytomass الأجزاء الجوية والجذرية، وكذلك في محتويات الكلوروفيل الكلي.

الكلمات المفتاحية: *Pseudomonas spp fluorescents* ، المستقلبات الثانوية ، lyophilization ، التخزين biocontrol حماية بيولوجية ،

Fusarium oxysporum f.sp. lycopersis.

LISTE DES FIGURES

FIGURE I.1 : RELATIONS PHYLOGÉNÉTIQUES DES PROTÉOBACTÉRIES, CONTENANT LES GENRES BACTÉRIENS ACTUELLEMENT OU ANCIENNEMENT (EN GRAS) ASSOCIÉS AUX <i>PSEUDOMONAS</i> (KERSTERS <i>ET AL.</i> , 1996).....	5
FIGURE I.2 : PRINCIPAUX CHANGEMENTS DANS LA TAXONOMIE DES <i>PSEUDOMONAS</i> (2212 ESPÈCES ONT ÉTÉ RÉORGANISÉS DANS LA LISTE HOMOLOGUÉE DE 1980); DONT 96 SONT DES <i>PSEUDOMONAS</i> (GRACIA-VALDE ET LALUCAT, 2016).....	7
FIGURE I.4 : BOUCLE DE RÉTROACTION REPRÉSENTANT L'INTERACTION BÉNÉFIQUE PLANTE-RHIZOBACTÉRIES (VACHERON, 2015 MODIFIÉ DE LEMANCEAU <i>ET AL.</i> , 2014).	11
FIGURE I.5 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES MÉTABOLITES SECONDAIRES PRODUITS PAR LES <i>PSEUDOMONAS</i> FLUORESCENTS DANS LA RHIZOSPHERE IMPLIQUÉS DANS LE BIOCONTRÔLE DES PHYTOPATHOGÈNES (MISHRA ET ARORA ,2017).....	12
FIGURE I.6 : 1-AMINOCYCLOPROPANE-1- CARBOXYLATE (ACC DÉSAMINASE) CHEZ LES PGPR (PATEL ET MINOCHEHERHOMJI, 2018).....	23
FIGURE II.1 : CLÉ DICHOTOMIQUE D'IDENTIFICATION DES <i>PSEUDOMONAS</i> SPP. FLUORESCENTS (BOSSIS, 1995).	35
FIGURE II.2 : COURBE CARACTÉRISTIQUE D'UN ADN INTÈGRE.....	41
FIGURE II.3 : RÉPARTITION SPÉCIFIQUE ET INFRA SPÉCIFIQUE DES SOUCHES SELON LES BIOTOPES.	48
FIGURE II.4 : AFFILIATION DES SOUCHES BACTÉRIENNES SELON LES TESTS BIOLOG GENIII	51
FIGURE II.5 : GEL REPRENANT LES 5 ADN AMPLIFIÉS ET LE MARQUEUR DE POIDS MOLÉCULAIRE.....	52
FIGURE II.6 : ARBRE PHYLOGÉNÉTIQUE (ARNR 16S) DES ESPÈCES VALIDÉES AVEC DES SIMILARITÉS $\geq 97\%$	55
FIGURE III.1 : PROTOCOLE DE PRODUCTION ET D'EXTRACTION DES PHÉNAZINES.....	68
FIGURE III.2: BIOAUTOGRAPHIE DES EXTRAITS DES SURNAGEANTS DE CULTURES DES SOUCHES PI9, BB9 ET F21 SUR AM APRÈS RÉVÉLATION	78
FIGURE III.3 : BIOAUTOGRAPHIE DES EXTRAITS DES SURNAGEANTS DE CULTURE DES SOUCHES PI9, BB9, F21 SUR CA APRÈS RÉVÉLATION	79
FIGURE III.4 : PROFIL D'HPLC DE L'ÉTALON.....	80
FIGURE III.5 : PROFIL HPLC APRÈS INJECTION DE L'EXTRAIT À L'ACÉTATE D'ÉTHYLE DE L'ISOLAT F21.....	80
FIGURE III.6 : PROFIL D'HPLC APRÈS INJECTION DE L'EXTRAIT À L'ACÉTATE D'ÉTHYLE DE L'ISOLAT BB9	80
FIGURE III.7 : PROFIL D'HPLC APRÈS INJECTION DE L'EXTRAIT À L'ACÉTATE D'ÉTHYLE DE L'ISOLAT PI9.....	81
FIGURE III.8 : PROFIL D'HPLC APRÈS INJECTION DE L'EXTRAIT À L'ACÉTATE D'ÉTHYLE DE L'ISOLAT CHAO.....	81
FIGURE IV.1 : DENSITÉS BACTÉRIENNES AVANT LYOPHILISATION ET APRÈS FORMULATION	96

FIGURE VI.2 : VIABILITÉ DU TÉMOIN (A04-BB9) EN CYTOMETRIE EN FLUX	97
FIGURE IV.4 : VIABILITÉ (%) DES SOUCHES DE <i>PSEUDOMONAS</i> APRÈS STOCKAGE.	100
FIGURE V.1 : RÉHYDRATATION ET PURIFICATION DE <i>PSEUDOMONAS</i> SPP. FLUORESCENTS LYOPHILISÉES.....	111
FIGURE V.3 : DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL (3 BLOC ALÉATOIRE COMPLETS).....	116
FIGURE V.4 : ECHELLE D'ÉVALUATION DES SYMPTÔMES TYPIQUES DE LA FUSARIOSE VASCULAIRE DE LA TOMATE	117
FIGURE V.5 : EVOLUTION DE LA FUSARIOSE VASCULAIRE (INFECTION ET SÉVÉRITÉ (INDICE MCKINNEY, EN SITUATION DE BIOCONTRÔLE AVEC LES SOUCHES BB9 (A) , BB10 (B) ET F21 (C) . (AP) LYOPHILISAT AVEC PROTECTEUR, (SP) LYOPHILISAT SANS PROTECTEUR, CR (CRÈME FRAICHE), (T+) TÉMOIN POSITIF SANS BACTÉRISATION INOCULE PAR LE PATHOGÈNE.....	122
FIGURE V.6 : L'ÉCHELLE DE SYMPTOMATOLOGIE DE LA FUSARIOSE VASCULAIRE DE LA TOMATE.....	123
FIGURE V.7 : SYMPTÔME DE LA FUSARIOSE VASCULAIRE CHEZ LES PLANTS DE TOMATES	124
FIGURE V.8 : BRUNISSEMENT DES RACINES DES PLANTS MALADES	124
FIGURE V.9 : STADE ULTIME (54 JOURS) DE LA FUSARIOSE VASCULAIRE	125
FIGURE V.10 : BIOPROTECTION DES PLANTS DE TOMATE.....	126
FIGURE V.11 : OBSERVATION SUR MICROSCOPE PHOTONIQUE AU DES SYMPTÔMES INTERNES TYPIQUES DE F.O.L D'UNE PLANTE INFECTÉ ET BACTÉRISÉ PAR BB10 S.P	127
FIGURE V.12 : OBSERVATION MICROSCOPIQUE DES SYMPTÔMES INTERNES TYPIQUES DE F.O.L D'UNE PLANTE INFECTÉ ET BACTÉRISÉS PAR F21 S.P.	127
FIGURE V.13 : COLONISATION RACINAIRE D'UNE PLANTE BACTÉRISÉE (BB10 AVEC PROTECTEUR).....	128
FIGURE V.14 : PROMOTION DE LA CROISSANCE DE LA PARTIE AÉRIENNE DES PLANS BACTERISÉS PAR RAPPORT AU TÉMOIN POSITIF.....	129
FIGURE V.15 GAINS (%) EN PARAMÈTRES DE CROISSANCE.....	129
FIGURE V.16 GAINS (%) EN TENEUR CHLOROPHYLLIENNE.....	130

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I.1 : MÉTABOLITES SECONDAIRES DES <i>PSEUDOMONAS</i> FLUORESCENTS ÉTUDIÉS DANS LE CONTRÔLE BIOLOGIQUE DES PHYTOPATHOGÈNES (MISHRA ET ARORA, 2017).....	13
TABLEAU II. 1 : NOMBRE ET ORIGINE DES SOUCHES BACTÉRIENNES RETENUES	40
TABLEAU II.2 : RÉACTIFS UTILISÉS POUR L'AMPLIFICATION PCR.....	42
TABLEAU II.3 RÉPARTITION DES SOUCHES ISOLÉES SELON LES BIOTOPES.....	45
TABLEAU II.4. : IDENTIFICATION SPÉCIFIQUE DES SOUCHES	45
TABLEAU II.5 : SPECTRES DE RÉPONSES D'IDENTIFICATION SPÉCIFIQUE ET INFRASPÉCIFIQUE	46
TABLEAU II-6 : RÉPARTITION DES SOUCHES SELON LA PLANTE HÔTE.	47
TABLEAU II.7 : ACTIVITÉS ANTAGONISTES <i>IN VITRO</i>	49
TABLEAU II.8 : TAUX D'INHIBITION DE LA CROISSANCE MYCÉLIENNE DES AGENTS FONGIQUES.	49
TABLEAU II.9 : IDENTIFICATION COMPARATIVE (BIOLOG GENIII ET L'ADNR 16S).....	54
TABLEAU III.1 : TESTS DE PRODUCTION DE MÉTABOLITES SECONDAIRES.....	71
TABLEAU III.2 : PRODUCTION DE CYANIDE D'HYDROGÈNE	72
TABLEAU III.3: PRODUCTION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE D'ACIDE INDOLE ACÉTIQUE (AIA).....	73
TABLEAU III.4 : ACTIVITÉS ANTAGONISTES <i>IN VITRO</i>	75
TABLEAU III.5 : ACTIVITÉS ANTAGONISTES <i>IN VITRO</i>	76
TABLEAU III.6: ACTIVITÉS ANTAGONISTES EXPRIMÉES EN ZONES D'INHIBITION (MM).	77
TABLEAU IV.1 : CROISSANCE DES SOUCHES DE <i>PSEUDOMONAS</i> AUX TEMPÉRATURES TESTÉES.....	94
TABLEAU IV.2 : COMPOSITION EN ACIDES GRAS CELLULAIRES (AGC)	95
TABLEAU IV.3 : EFFETS DE LA LYOPHILISATION ET DE LA CRYOPROTECTION SUR LA VIABILITÉ (%)......	96
TABLEAU IV.4 : VIABILITÉ (%) DES SOUCHES DE <i>PSEUDOMONAS</i> APRÈS STOCKAGE À 4° C.	99
TABLEAU V.1 : ORIGINE DES SOUCHES SÉLECTIONNÉES.....	111
TABLEAU V.2 : TAUX D'INHIBITION (%) DE LA CROISSANCE MYCÉLIENNE	120

LISTE DES ABREVIATIONS

°C	degré Celcius
ADN	Acide Désoxiribo Nucléique
AIA	Acide indole actéique
ARN	Acide ribonucléique ribosomal
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
BET	Bromure d'éthydiium
BBCM	Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, Laboratory of Microbiology
CCM	Chromatographie en couche mince
CFDA	Carboxyfluoresceindiacétate
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
cv.	cultivar
DO	Densité optique
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EMBL	EuropeanMolecularBiologyLaboratory
g	gramme
h	Heure
G/C	Guanine/Cytosine
HCN	Cyanure d'hydrogène
HPLC	High Pressure LiquidChromatography
HR	HypersensitiveResponse (Réaction d'hypersensibilité)
ISR	InducedSystemicResistance (Induction Systémique de Résistance)
Kb	Kilo paire de bases
LMG	Laboratory of Microbiology Gent
m	Mètre
min	Minute
ml	Millilitre
MPM	Marqueur de poids moléculaire
µl	Microlitre
nm	Nanomètre
nmole	Nanomole
NJ	Neighbour - Jorning
Pb	paire de bases
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasechainreaction
PFA	Paraformaldéhyde
PGPR	Plant GrowthPromotingRhizobacteria
Phl	2,4- diacetylphloroglucinol (DAPG)
Phz	Phénazines
Plt	Pyoluteorines
PR	RelatedProteins
Pm	Pyrrrolnitrines
pv.	Pathovar
pvd	Pyoverdine
QS	Quorum sensing
RH	Réponse hypersensible (Réaction d'hypersensibilité)
rpm	Rotation par minute
sid	Sidérophores
TAE	Tris Acétate -EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
ufc	Unité formant colonie
UPGMA	Unweighted Pair Group Méthode withAverage
UV	Ultra-Violet

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

Les niveaux actuellement atteints en productions agricoles, tant qualitatif que quantitatif, sont la résultante d'une mécanisation élargie, accompagnée de l'usage systématique des intrants chimiques (fertilisants et pesticides). Le secteur agricole utilise plus de 90% du totale des pesticides commercialisés dans le monde. Les dépenses mondiales en substances chimiques sont estimées à plus de 56 milliards de dollars, avec l'utilisation de plus de 3,5 milliards de kg de principes actifs /an (Pretty et Bharucha, 2015 ; Atwood et Paisley-Jones, 2017). De telles pratiques, caractéristiques de l'agriculture intensive, ont engendré le développement de formes de bioagresseurs de plus en plus résistantes, ajouté aux problématiques de pollution et des risques de santé, remettant sérieusement en cause ces procédures agrochimiques. Ainsi, la recherche d'alternatives durables et biologiques, limitant, diminuant ou même bannir, l'usage systématique des produits chimiques, est devenue un objectif à atteindre (Loboa et *al.*, 2019).

Dans le contexte de la valorisation de la biomasse microbienne, de nombreux travaux, depuis plus de trois décennies, ont souligné l'opportunité de l'exploitation de certaines catégories de microorganismes telluriques, adaptées à la vie rhizosphérique des plantes et peuvent procurer des effets phytobénéfiques. La masse des travaux dédiée à ce sujet montre qu'il s'agit d'un réel attrait pour les chercheurs, ainsi nous assistons à l'investigation de divers profils, de la microbiologie du sol, des associations microbiennes, de leurs mécanismes d'action et autres voies métaboliques modulant la vie rhizosphérique et leurs relations avec les plantes. Actuellement des ressources microbiennes sont valorisées pour des usages biologiques, en qualité de biofertilisants, de biostimulants et/ou de biopesticides, permettant ainsi d'améliorer les rendements tout en limitant le recours excessif aux intrants chimiques (engrais et pesticides) (Gupta et *al.*, 2016).

Parmi les rhizobactéries, le groupe des *Pseudomonas* fluorescents est l'un des pôles microbiens ayant démontré des potentialités phytobénéfiques certaines (Lemanceau ,1992 ; Latour et *al.*, 2009 ; Lemanceau *et al.*, 2014; 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; de

plus ils représentent un modèle d'étude pour la compréhension des interactions avec les microorganismes d'une part (*Pseudomonas* – champignons et bactéries pathogènes), et avec la plante (eucaryote – procaryote) d'autre part (Van Lonn et Glick, 2004; Pozo *et al.*, 2004). 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 (Lemanceau, 1992 ; Weller, 2007 ; Van Lonn, 2007 ; Loper *et al.*, 2011 ; Figueroa-Lopez *et al.*, 2016) .

Ces rhizobactéries peuvent devenir un complément ou même une réelle alternative pour les techniques de lutte et de fertilisation chimiques, particulièrement pour les maladies telluriques qui sont souvent mal maîtrisées par les techniques conventionnelles (luttés chimique et génétique). Ces maladies, affectant les racines et/ou les systèmes conducteurs des plantes, sont souvent causées par des agents fongiques se caractérisant par des formes de persistance et de conservation durables et un pouvoir infectieux épidémique destructif des cultures (Benchabane, 2005).

Leur utilisation en qualité d'intrant biologique, certes dépend de leurs mécanismes d'action, mais aussi de leur efficacité déterminée par une compétence rhizosphérique dans les conditions pratiques (Hofte et Altier 2010 ; Cipriano et Freitas, 2018). L'hétérogénéité des sols constitue un obstacle considérable pour les inoculats, car les bactéries introduites doivent concurrencer un microbiote indigène mieux adapté et survivre à la prédation par la microfaune du sol, en particulier lorsqu'elles sont inoculées sous une forme non protégée. Ainsi, les inoculats devraient fournir un microenvironnement plus approprié, associé à une protection physico-chimique sur une longue période, qui empêcherait la diminution rapide des bactéries introduites (Shahzad *et al.*, 2017; Berninger *et al.*, 2018; Liffourrena et Lucchesi, 2018). Par conséquent, le but des formulations d'inoculants est de permettre une survie plus élevée du PGPR à la fois pendant le stockage et sur le site d'application, sous des formes adaptées et disponibles.

Généralement, les formulations utilisées sont des préparations lyophilisées pour l'obtention de concentrés bactériens de qualité acceptable, comportant des cellules viables et cultivables, avec une reprise maximale d'activités lors de leur utilisation

(Coulibaly et *al.*, 2010 ; Corrêa, 2015 ; Seema et *al.*, 2018). De tels procédés, incluant les étapes de production, de conditionnement et de stockage provoquent des situations de stress sur la masse microbienne, induisant des dysfonctionnements physiologiques, mettant en cause leur qualité technologique.

Vu ce qui précède, ce travail prend toute son importance en mettant en évidence l'exploitation pratique de quelques souches du groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Dans notre projet de thèse, nous avons structuré notre travail, de telle sorte à sélectionner des souches, isolées localement et d'en réaliser un travail microbiologique aboutissant à une application pratique. Il est à souligner, que les souches rhizobactériennes recherchées doivent procurer des effets phytobénéfiques, que ce soit en phytostimulation et/ou en biocontrôle des parasites phytopathogènes.

A cet effet, nous avons adopté des méthodologies appropriées pour les différentes parties de notre travail. Ainsi, après une introduction générale et la présentation d'une synthèse bibliographique sur les travaux relatifs à notre sujet (chapitre I), le deuxième chapitre présente les circonstances et les techniques utilisées dans la recherche, l'isolement et les critères de caractérisation et de classification des souches bactériennes. Dans le troisième chapitre, nous avons testé les potentialités des souches bactériennes en production de métabolites incriminées, directement ou indirectement, dans les processus phytobénéfiques de biocontrôle et de phytostimulation.

Étant donné que la finalité de notre travail est l'aboutissement vers des préparations microbiennes à usage agronomique pratique, le quatrième chapitre traite des expérimentations de conception de formulations lyophilisées, à base de souches bactériennes sélectionnées, selon des profils présentant des potentialités phytobénéfiques. Le dernier chapitre est réservé à tester l'efficacité des formulations conçus, par des tests *in vitro* et *in situ*, dont les objectifs sont à la fois de s'assurer de la viabilité de nos préparations microbiologiques, après les processus de formulation et de stockage, aussi de l'efficacité de leur emploi à titre de bioinoculant dans le biocontrôle.

Au terme de ce travail, nous tentons d'expliquer et d'interpréter les différentes étapes à travers une discussion générale suivie d'une conclusion générale.

CHAPITRE I: DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I: DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I.1. Introduction au genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* est l'un des genres les plus diversifiés, de par sa composition, regroupant de nombreuses espèces et de par leurs origines issues des différents écosystèmes. La description taxonomique de ce genre ne cesse de voir des réarrangements et des changements de statuts (espèces, sous espèces et nouvelles espèces), depuis ses premières descriptions (Migula, 1894 ; Palleroni, 1984). Avec l'application des résultats du séquençage de l'ADNr 16S, certaines des espèces de ce genre ont été redistribuées dans d'autres genres des sous-classes alpha, bêta ou gamma des protéobactéries (Kerstens *et al.*, 1996 ; Rajwar et Sahgal, 2014). Les membres du genre *Pseudomonas* (sensu stricto) appartiennent au groupe I de la sous-classe des gamma-protéobactéries (Figure I.1).

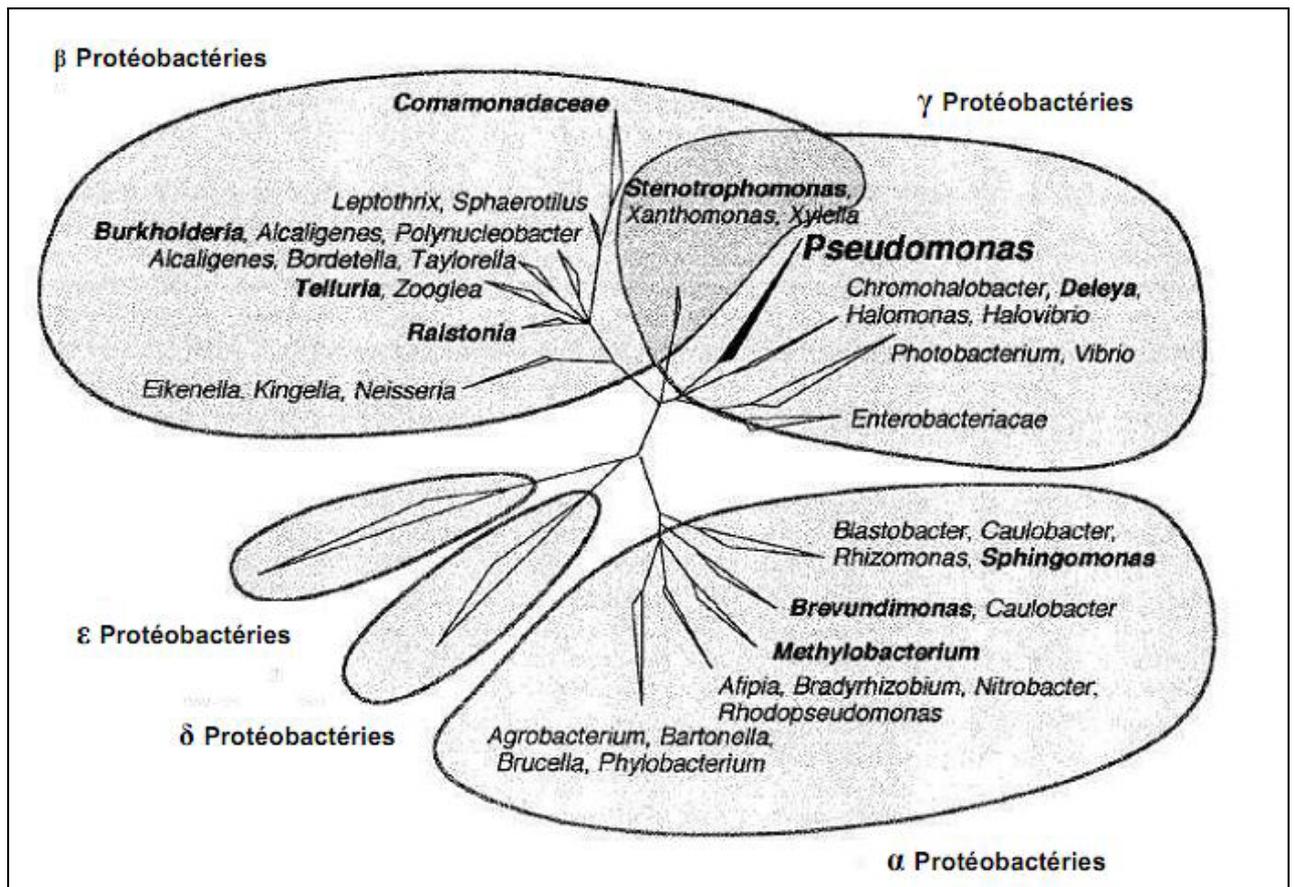


Figure.I.1 : Relations phylogénétiques des protéobactéries, contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas* (Kerstens *et al.*, 1996).

I.2. Evolution de la taxonomie du genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* a été décrit à la fin du 19^{ème} siècle (Migula, 1894), en se basant sur les morphologies macro et microscopiques, pratique universellement adoptée par les taxonomistes microbiens (Cohn, 1872). Depuis ces premières descriptions, ce genre n'a cessé d'enregistrer des réorganisations (Figure I.2) (Garrido-Sanz et al., 2016).

A partir du début du 20^{ème} siècle, les caractéristiques physiologiques étaient proposées comme critères de base pour la taxonomie bactérienne (Orla-Jensen, 1909). Dans le manuel de Bergey publié en 1923, plusieurs caractéristiques phénotypiques ont été ajoutées à la morphologie, à la coloration de Gram, au type de flagellation et au métabolisme vis-à-vis de l'oxygène, afin de différencier les espèces du genre *Pseudomonas* (Bergey et al., 1997). Avec l'avènement des techniques basées sur l'ADN, des approches génétiques ont été utilisées en taxonomie bactérienne (Marmur, 1961 ; Marmur et Dotty, 1961; Schildkraut et al., 1961) ; ainsi, la composition en bases (G + C) et l'hybridation ADN-ADN ont été sollicitées dans la classification des *Pseudomonas* (Colwell et Mandel, 1964; Colwell et al., 1965; Johnson et Ordal, 1968 ; Doudoroff et Palleroni, 1974). Les bactéries de ce genre ont été divisées en cinq sous-groupes d'ARNr sur la base des hybridations ARN-ADN (Palleroni, 1984).

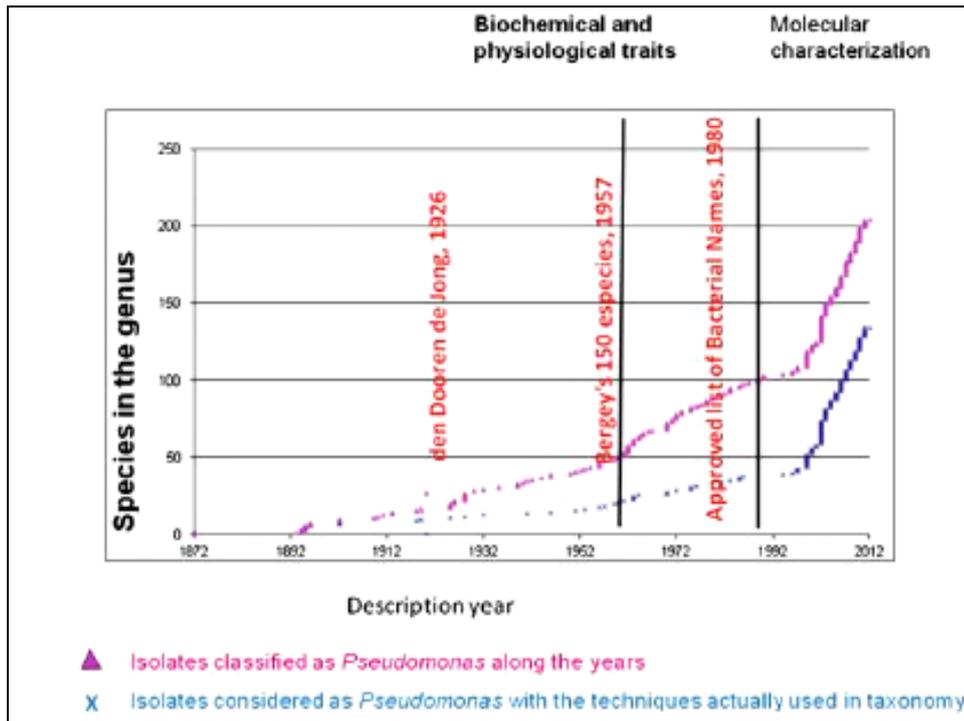


Figure I.2 : Principaux changements dans la taxonomie des *Pseudomonas* (2212 espèces ont été réorganisées dans la liste homologuée de 1980); dont 96 sont des *Pseudomonas* (Gracia-Valde et Lalucat, 2016)

Les changements les plus profonds dans la taxonomie bactérienne se sont produits dans les années 1980, lorsque Woese et ses collaborateurs ont proposé l'analyse des séquences géniques de l'ARN ribosomal 16S pour la classification des bactéries, plaçant le genre *Pseudomonas* dans les gamma protéobactéries (Woese et al., 1984). Néanmoins, le plus pertinent de ces changements a commencé à partir de l'année 2000, avec un premier travail compilant les séquences du gène ARNr 16S de 128 espèces de *Pseudomonas* (Anzai et al., 2000), qui ont montré que de nombreuses espèces ne faisaient pas partie du groupe *Pseudomonas sensu stricto*, aboutissant à la définition de plus de 25 genres appartenant aux classes Alpha, Beta et Gamma des Protéobactéries (Peix et al., 2009 ; García-Valdés et Lalucat, 2016). Ces modifications ont été consignées dans l'édition 2005 du Manuel référentiel de Bergey, en systématique bactérienne, qui est passée du format imprimé au format en ligne en 2015, permettant des mises à jour continues, marquées par des augmentations de publications en nombre des genres et des espèces (Peix et al., 2018). Il y en avait 118 en 2009 (Mulet et al., 2010) ,10 espèces supplémentaires en 2013 et six en 2014 (Parte, 2014). 213 espèces de *Pseudomonas* sont citées dans la liste des procaryotes, mais seulement 147 sont acceptées (Gomila et al., 2015).

Actuellement le genre *Pseudomonas* contient plus de 190 espèces (<http://www.bacterio.ne/pseudomonas.html>). Selon Peix et al., (2018), en se basant sur les analyses phylogénétiques et chimiotaxonomiques, Il est fortement probable que ce genre sera réaménagé, dans un futur proche, en divers genres et espèces.

I.3. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents

Au sein du groupe *Pseudomonas sensu stricto*, les *Pseudomonas* fluorescents comprennent toutes les espèces ayant la capacité de produire de la pyoverdine fluorescente, particulièrement : *Pseudomonas aeruginosa*, *P. syringae*, *P. putida* et *P. fluorescens* (Palleroni, 2009). Les espèces types sont: *P.aeruginosa*, agent pathogène humain, opportuniste fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales (Bentzmann et Plésiat, 2011) et *P. syringae*, un phytopathogène de diverses espèces de plantes cultivées (Morris et al., 2007).

Les *Pseudomonas* fluorescents saprophytes sont des habitants typiques des sols agricoles et interagissent avec les plantes de plusieurs façons (Kloepper et Schroth, 1981). Dans ce groupe, les espèces saprophytes sont à cytochrome oxydase positive, ayant une arginine dihydrolase et ne provoquent pas de réaction d'hypersensibilité sur tabac (Stanier et al., 1966; Palleroni, 1984 et 1992). De nombreuses espèces accumulent des polyhydroxyalcanoates (mcl-PHA), comme réserve de carbone (Anjum et al., 2016), et montrent une polyvalence métabolique avec un taux élevée en G + C (59- 68%) (Palleroni, 2009 ; Mishra et Arora ,2017).

Initialement, les *Pseudomonas* spp. fluorescents renfermaient trois espèces : *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* et *P. putida*, qui se caractérisent par une grande hétérogénéité phénotypique et génotypique (Bossis et al., 2000). Les deux dernières espèces ont été subdivisées, sur la base de tests phénotypiques, respectivement en cinq (I à V), et deux (A et B) biovars (Stanier et al., 1966; Palleroni, 1984).

I.3.1 Les *Pseudomonas* spp. fluorescents Phytobénéfiques

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes sont des habitants typiques des sols agricoles, en s'impliquant dans de nombreuses interactions avec les plantes, notamment au niveau des rhizosphères (Schroth et al., 1992). Ces bactéries sont considérées comme des composés biologiques du sol agricole, douées de potentialités suppressives et inhibitrices de diverses maladies des plantes. De nombreuses études ont mis en évidence les aptitudes de souches de *Pseudomonas*

spp. fluorescents dans l'amélioration de la croissance et la protection sanitaire des plantes (Lemanceau, 1992; Viebahn *et al.*, 2005 ; Mavrodi *et al.*, 2012 ; Sharifi-Noori *et al.*, 2015; Hussein et Joo, 2017; Mishra *et al.*, 2018).

Ce groupe bactérien est assigné aux rhizobactéries dites **PGPR** "Plant Growth Promoting Rhizobacteria" (Kloepper *et al.*, 1980). Ces rhizobactéries peuvent contribuer dans la lutte biologique contre les agents phytopathogènes et dans la biofertilisation des sols dans les pratiques de l'agriculture durable et intégrée, prônant la limitation de l'utilisation des intrants chimiques. Les effets positifs des PGPR, s'expliquent en partie par le contrôle des agents phytopathogènes (Kloepper *et al.*, 1980; Schnider-Keel *et al.*, 2000; Herth, 2011; Maheshwari, 2011; Lemanceau *et al.*, 2012; Le Mire *et al.*, 2016 Prabhukarthikeyan *et al.*, 2018) et la stimulation de la croissance des plantes (Digat et Gardan, 1987; Karakurt et Aslantas, 2010; Gupta *et al.*, 2013 ; Calvo *et al.*, 2014; Le Mire *et al.*, 2016; Tabassum *et al.*, 2017; Novo *et al.*, 2018).

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 des végétaux (Beauchamp, 1993; Jacque *et al.*, 1993; Walsh *et al.*, 2001; Haas et Defago, 2005; Weller, 2007; Ahmad *et al.*, 2008; Beneduzi *et al.*, 2012; Benchabane *et al.*, 2013; Upadhyay *et al.*, 2016; Figueroa-Lopez *et al.*, 2017; Novo *et al.*, 2018). Ils représentent un modèle d'étude pour la compréhension des interactions avec les microorganismes d'une part (*Pseudomonas* – champignons et bactéries pathogènes), d'autre part avec la plante (eucaryote – procaryote).

La compréhension des mécanismes d'action et des conditions permettant l'optimisation des effets bénéfiques, de ces rhizobactéries, constitue une voie indispensable pour leur exploitation dans les pratiques agronomiques comme biopesticides et/ou biofertilisants, afin de diminuer la dépendance excessive en intrants chimiques dont les effets négatifs sur la santé et l'environnement ne sont plus à démontrer. Ces rhizobactéries peuvent devenir un complément ou même une réelle alternative pour les techniques de lutte et de fertilisation chimiques (Benchabane *et al.*, 2013).

Les bactéries du groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents sont retrouvées abondantes dans la rhizosphère de nombreuses plantes (Couillerot *et al.* 2009 ;

Almario *et al.*, 2014 ; Haney *et al.*, 2015) et possèdent une large gamme de fonctions phytobénéfiques avec différents modes d'action sur le végétal (Ahmad *et al.*, 2008 ; Loper *et al.*, 2012). Ces rhizobactéries peuvent agir sur :

- Le développement de la plante, par modification de l'architecture racinaire en produisant des hormones ou en modulant la production hormonale végétale (Garcia de Salamone *et al.*, 2001; Picard et Bosco, 2005; Shaharoon *et al.*, 2006).
- La nutrition des plantes, par la biodisponibilité de certains minéraux essentiels, comme le phosphore et le fer (Meyer *et al.*, 2010).
- La santé des plantes, en produisant des métabolites secondaires antimicrobiens, pouvant nuire au développement de phytopathogènes et/ou activer les mécanismes de défenses de la plante (Bakker *et al.*, 2007, Gross et Loper 2009).

La production de métabolites secondaires chez ces rhizobactéries peut également réguler l'expression de gènes phytobénéfiques chez d'autres PGPR parmi le rhizomicrobiote (Combes-Meynet *et al.*, 2011). Du fait de ce large éventail de fonctions phytobénéfiques, ces rhizobactéries ont un rôle écologique primordial dans la rhizosphère. C'est en particulier le cas dans les sols qualifiés de «sols résistants» où leur implication dans la résistance naturelle de certains sols à quelques maladies a été démontrée (Mazzola *et al.*, 2002, Ramette *et al.*, 2003; Lemanceau *et al.*, 2014; Vacheron, 2015). La libération des exsudats racinaires représente une dépense métabolique pour la plante, qui va être investie dans la sélection de populations microbiennes particulières. En retour, certaines populations sélectionnées ont un impact positif sur la croissance et la santé de la plante, en lui exprimant des fonctions bénéfiques (Figure I. 4) (Vacheron, 2015).

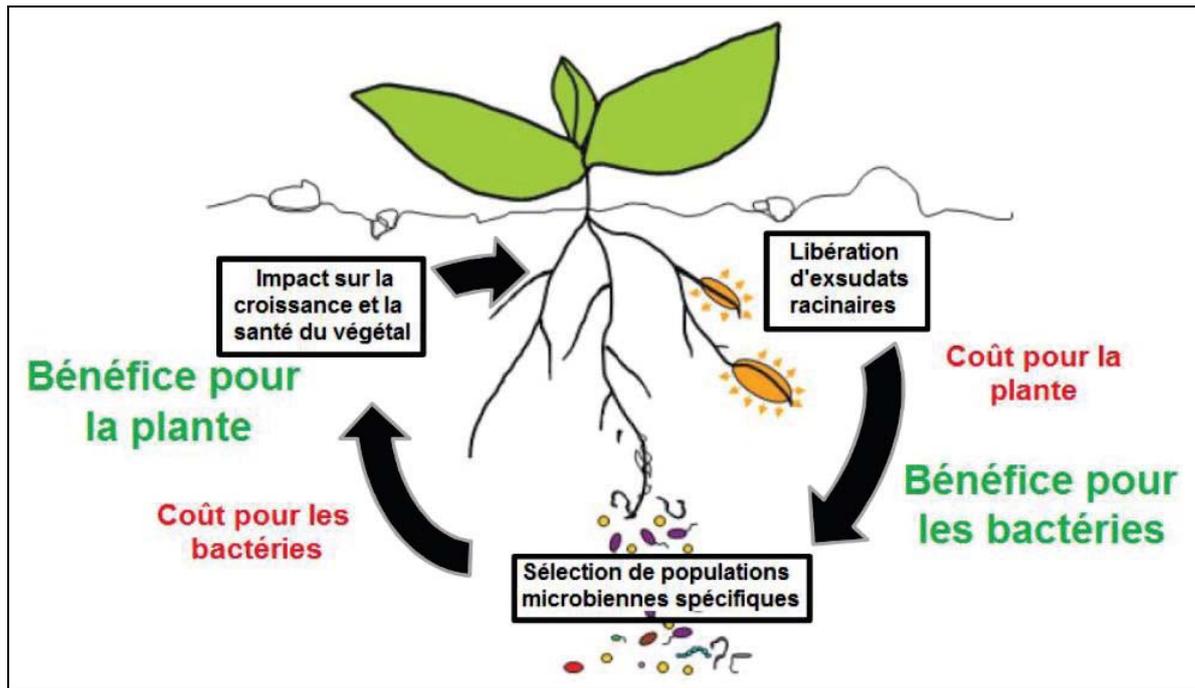


Figure I. 4 : Boucle de rétroaction représentant l'interaction bénéfique plante-rhizobactéries (Vacheron, 2015 modifié de Lemanceau *et al.*, 2014).

Les *Pseudomonas* fluorescents ont développé des mécanismes pour améliorer la croissance et le développement des plantes dans diverses conditions environnementales (Figure I.5). Selon Kloepper et Schroth (1981), la promotion de la croissance des plantes à médiation par les rhizobactéries favorise la modification de toute la communauté microbienne dans la niche rhizosphérique par la production de diverses substances. Généralement, les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes directement, en leur assurant une biodisponibilité de nutriments (azote, phosphore, potassium et minéraux essentiels), ou en modulant indirectement, les effets de divers agents phytopathogènes par voie de biocontrôle (Charde *et al.*, 2010; Maheshwari, 2011; Gupta *et al.*, 2015; David *et al.*, 2018).

Les *Pseudomonas* fluorescents agissent via différents mécanismes pour supprimer les agents pathogènes des plantes, entre autres la compétition pour les nutriments et l'espace (Elad et Baker, 1985; Elad et Chet, 1987), l'antibiose en produisant des antibiotiques (Pierson et Thomashow, 1992), de sidérophores (Kloepper *et al.*, 1980; Lemanceau *et al.*, 1992 ; Ongena *et al.*, 2005), d'enzymes lytiques (Lim *et al.*, 1991; Frindlender *et al.*, 1993; Potgieter et Alexander, 1996; Velazhahan *et al.*, 1999), de l'HCN et autres métabolites (Defago *et al.*, 1990; Borowitz *et al.*, 1992).

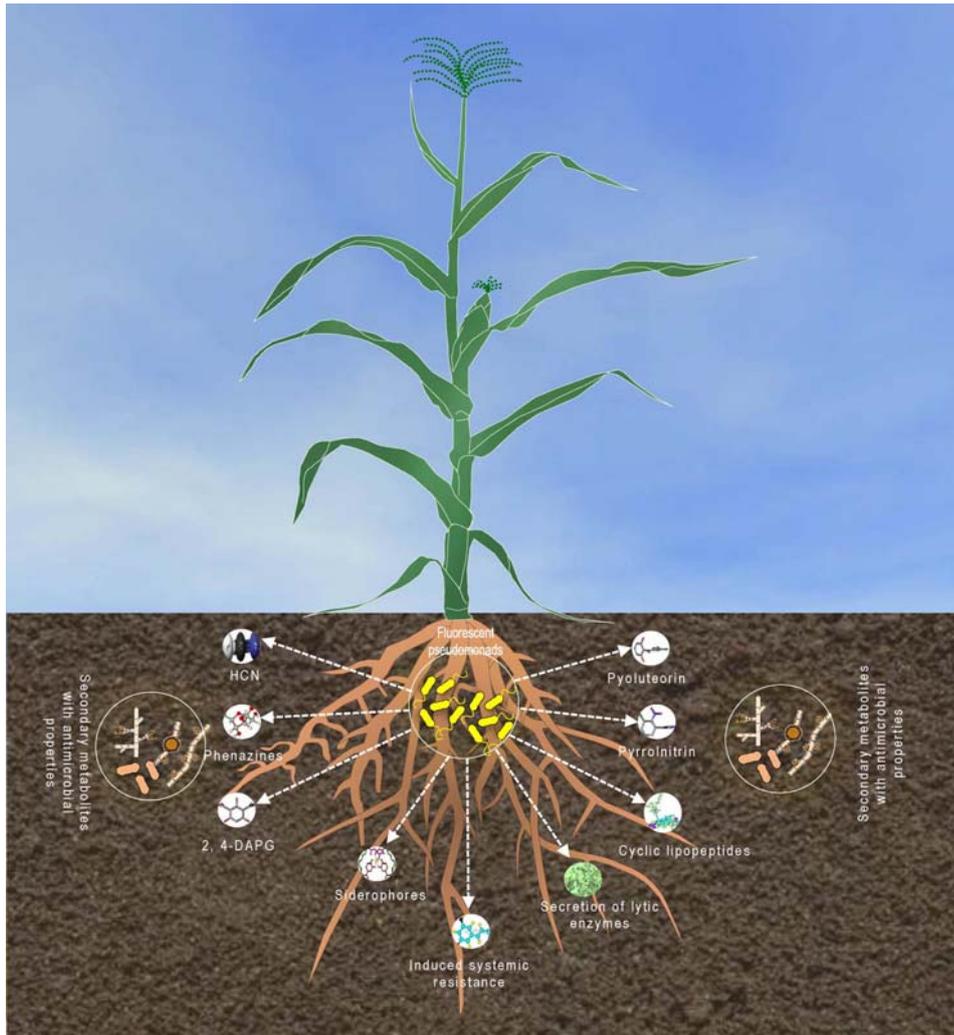


Figure I.5 : Représentation schématique des métabolites secondaires produits par les *Pseudomonas fluorescens* dans la rhizosphère impliqués dans le biocontrôle des phytopathogènes (Mishra et Arora ,2017).

I.3.2. Métabolites secondaires phyto-bénéfiques

Il est reconnu que les PGPRs sont dotées d'une machinerie de biocontrôle de pointe et sont donc utilisées pour le développement de bioinoculants, ciblant la protection des cultures contre une large gamme de phytopathogènes (Ciancio et *al.*, 2016; Mishra et Arora, 2017; Sun et *al.*, 2017; Jeyanthi et Kanimozhi, 2018). Ces rhizobactéries ont développé la capacité de synthétiser divers métabolites secondaires, qui leur offrent un avantage sélectif par rapport aux autres microorganismes rhizosphériques (Tableau I.1).

Tableau I.1 : Métabolites secondaires des *Pseudomonas* fluorescents étudiés dans le contrôle biologique des phytopathogènes (Mishra et Arora, 2017).

Métabolites	<i>Pseudomonas</i>	Phytopathogènes	Effets	Références
HCN	<i>Pseudomonas</i> sp. P76 and P124	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Diverses plantes	Priyanka et al., (2017)
	<i>Pseudomonas</i> sp. LBUM300	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Tomate	Lanteigne et al., (2012)
	<i>Pseudomonas</i> CF1 and CF5 <i>P. corrugata</i> and <i>P. mediterranea</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i> <i>B. cinerea</i>	in-vitro in-vitro	Reetha et al., (2014) Strano et al., (2017)
HCN et autres métabolites volatiles	<i>P. donghuensis</i> P482	<i>Ralstonia solani</i> , <i>Fusarium. culmorum</i> et <i>Pythium ultimum</i> <i>F. graminearum</i> et <i>R. solani</i>	in-vitro	Ossowicki et al., (2017)
PRN	<i>P. chlororaphis</i> O6 <i>P. cepacia</i> <i>P. fluorescens</i>	<i>Aphanomyces cochlidos</i> <i>Pythium ultimum</i> <i>Colletotrichum truncatum</i> et <i>F. sambucinum</i>	Tomate Canne à sucre Légumineuses in-vitro	Park et al., (2011) Homma (1994) León et al. ,(2009) Burkhead et al. (1994)
	<i>P. cepacia</i>	<i>Gaeumannomyces graminis var. tritici.</i>	in-vitro	Thomashow et Weller (1988), Thomashow et al., (1990)
PCA	<i>P. fluorescens</i>	<i>F. oxysporum f.sp. ciceris</i> et <i>F. udum</i>	Blé Légumineuses	Anjaiah et al., (2003)
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>F. oxysporum</i>	In-vitro	Patil et al., (2017)
2,4-DAPG	<i>Pseudomonas</i> spp. MCC 3145	<i>C. circinans</i> , <i>C. dematium</i> , <i>F. oxysporum</i>	Blé	Jaaffar et al., (2017)
	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>P. aurantiaca</i>	<i>R. solani</i> <i>F. oxysporum</i>	Blé	Garagulya et al., (1974)
	<i>P. fluorescens</i> VUPf5	<i>G. graminis var. tritici</i> <i>C. michiganensis</i> subsp.	Blé	Lagzian et al., (2013)
	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>michiganensis</i> <i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae (Xoo)</i>	Tomate Rizier	Lanteigne et al., (2012) Velusamy and Gnanamanickam (2003)
	<i>P. fluorescens</i>	<i>F. oxysporum f. sp. cubense</i>	Bananier	Ayyadurai et al. (2006)
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Tomate	Lanteigne et al. (2012)
	<i>Pseudomonas</i> sp. LBUM300	<i>Aspergillus niger</i> , <i>K. flavus</i> , <i>S. rolfsii</i>	Groundnut	Sherathia et al. (2016)
CLPs	<i>P. fluorescens</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	in-vitro	Zhou et al. (2012)
	<i>P. fluorescens</i>	<i>R. solani</i> and <i>P. ultimum</i> <i>Phytophthora infestans</i>	Canne à sucre Tomate	Nielsen et al., (2000, 2002) Tran et al., (2007)
	<i>Pseudomonas</i> SH-C52	<i>S. rolfsii</i>	Arachide	Le, 2012

1.3.2.1. Phénazines (PHZ)

Les phénazines sont un groupe de composés hétérocycliques, à cycle azoté, identifiés chez les phyla *Actinobacteria*, *Proteobacteria* et le phylum *Euréarcheota* (Mavrodi et *al.*, 2001). Plus de 6000 composés contenant la phénazine en tant que fragment central ont été synthétisés, ainsi que plus de 100 dérivés structuraux naturels ont été reconnues par leurs propriétés antimicrobiennes (Mavrodi et *al.*, 2006). En fait, plus de 180 produits à base de PHZ sont connus avec des activités antibiotiques, antifongiques, insecticides, antitumorales, anticancéreuses, anti-protozoaires et autres activités anti-pathogènes (Guttenberger et *al.*, 2017).

Dans les PHZ, les substituants autour des cycles donnent naissance à des composés de couleurs différentes : les PHZ isolés de *Pseudomonas* spp. montrent une coloration bleue pour la pyocyanine (PYO), le jaune pour l'acide phénazine-1-carboxylique (PCA) et le phénazine-1-carboxamide (PCN) et l'orange pour la 1-hydroxyphénazine (1-HP) (Briard et *al.*, 2015). Les phénazines PCA et PYO se sont révélées très efficaces dans le traitement des maladies fongiques.

Bien que la plupart des PHZ soient efficaces dans la lutte biologique contre plusieurs maladies fongiques et bactériennes (Chincholkar et Thomashow, 2014), dans de nombreux cas, les mêmes dérivés de PHZ n'ont pas inhibé la croissance de bactéries concurrentes concomitantes (Beifuss et Tietze, 2005). La PHZ joue également un rôle important dans l'acquisition du fer, la signalisation cellulaire, la régulation de l'expression génique, la formation de biofilms et la survie des bactéries. Toutes ces fonctions aident les bactéries dans leur compétition et leur colonisation de la rhizosphère, procurant ainsi un avantage à leurs producteurs et éloignent les phytopathogènes (Pierson et Pierson, 2010).

Les chercheurs ont également indiqué le rôle de la PHZ dans le métabolisme primaire. Price-Whelan et *al.*, (2006) ont suggéré que PHZ peut réagir avec les métabolites primaires et se transformer par des enzymes impliquées dans les voies métaboliques centrales. Ces caractéristiques suggèrent leur rôle possible dans le métabolisme des cellules primaires, en particulier dans la survie de la cellule dans des conditions de stress.

1.3.2.2. Phloroglucinols

Le phloroglucinol (1,3,5-benzène-triol ou 1,3,5-trihydroxybenzène) et ses dérivés sont des composés phénoliques à large spectre, possédant des propriétés antivirales, antibactériennes, antifongiques, antihelminthiques et phytotoxiques (Loper et *al.*, 2012). Plus de 700 dérivés de phloroglucinol d'origine naturelle sont signalés de différentes sources naturelles y compris les plantes, les micro-organismes et les organismes marins (Singh et Bharate, 2006).

Chez les *Pseudomonas* fluorescents, la capacité de synthèse de phloroglucinol et de ses dérivés est hautement conservée (Weller, 2007; Raaijmakers et Weller, 2001). Un des principaux types de dérivés de phloroglucinol produits par les *Pseudomonas* fluorescents est le DAPG (Troppens et *al.*, 2013). Plusieurs études expérimentales affirment que le DAPG est un métabolite antimicrobien majeur impliqué dans le contrôle biologique des phytopathogènes (Sonnleitner et Haas, 2011). Le locus biosynthétique du DAPG serait conservé chez les *Pseudomonas* isolées de divers endroits géographiques (Keel et *al.*, 1996).

Le phloroglucinol et ses dérivés appartiennent à la classe des polycétides et leur biosynthèse se fait par condensation décarboxylative de monomères tels que l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA), la propionyl-CoA, la malonyl-CoA et la méthylmalonyl-CoA (PKSs) (Singh et Bharate, 2006). Il existe trois types distincts de PKS reconnus (Achkar et *al.*, 2005). La production de DAPG est déterminée par six facteurs structurels (phIA, phIC, phIB, phID et phII) et trois gènes régulateurs (phIF, phIG et phIH) (Kwak et *al.*, 2012; Mandryk-Litvinkovich et *al.*, 2017 ; Meyer et *al.*, 2016 ;Mishra et Arora, 2017).

1.3.2.3. Pyrolnitrine (PRN)

PRN est un arylpyrrole halogéné, initialement isolé à partir de *Burkholderia pyrrocina* (Arima et *al.*, 1964). La PRN est connue pour être produite par une gamme étroite de bactéries à Gram négatif, y compris les *Pseudomonas* spp (Mujumdar et *al.*, 2014; Weller et *al.*, 2016). La PRN produite par les *Pseudomonas* est connue pour avoir une activité antagoniste contre les champignons, les levures et les bactéries à Gram positif (Jani et *al.*, 2015). Le mécanisme de l'activité de la PRN implique l'inhibition du glycérol kinase, qui entraîne une fuite dans la membrane cellulaire via l'accumulation de glycérol (Pillonel et Meyer, 1997), cependant son mode d'action exact de la PRN n'est pas clair. Pour les *Pseudomonas* fluorescents,

la biosynthèse des PRN est réalisée en quatre étapes séquentielles et nécessite du tryptophane (Kirner et *al.*, 1998).

L'opéron biosynthétique de PRN est relativement petit (5,5 kb) et contient quatre gènes, *prnABCD* qui convertissent le tryptophane en PRN (Hammer et *al.*, 1997).

Le gène *prnD* catalyse une étape très importante de l'oxydation de l'aminopyrrolnitrin à PRN (Nakatsu et *al.*, 1995). Le gène *prnD* possédant des *Pseudomonas* fluorescents a été largement signalé dans les sols suppressifs et est particulièrement connu pour l'inhibition de *Rhizoctonia solani* (Steinberg et *al.*, 2006; Costa et *al.*, 2009).

Les dérivés chimiques de la PRN, connus sous le nom de phénylpyrroles, sont produits au niveau commercial et utilisés avec succès pour le traitement des semences et des feuilles afin de les protéger contre des phytopathogènes fongiques. Le fludioxonil, un analogue du phénylpyrrole, est efficace et utilisé contre plusieurs phytopathogènes fongiques (Kilani et Fillinger, 2014; Mishra et Arora, 2017).

1.3.2.4. Pyolutéorine (PLT)

Le PLT, un polycétide phénolique comprenant du pyrrole bichloré lié à un groupement résorcinol, a été tout d'abord isolé de *P. aeruginosa* et ensuite d'autres *Pseudomonas* fluorescents (Nowak-Thompson et *al.*, 1997). La PLT a des activités bactéricides, herbicides et fongicides (Takeda, 1958). Le groupe de gènes PLT ABCDEFG est requis pour la biosynthèse des PLT (Nowak-Thompson et *al.*, 1999). La PLT fonctionne également comme un auto-inducteur et comme signal intercellulaire entre des populations distinctes de cellules bactériennes cohabitant dans la rhizosphère (Brodhagen et *al.*, 2004).

Récemment, il a été étudié que le phloroglucinol avait une influence dépendante de la concentration sur l'expression des gènes de biosynthèse du PLT et la production de PLT chez *P. protegens* (Clifford et *al.*, 2016), induisant différents métabolites (DAPG et PLT) avec des mécanismes distincts et des cibles phytopathogènes (Mishra et Arora, 2017).

1.3.2.5. Mupirocine

Plus connu comme l'acide pseudomonique, est un antibiotique polycétide naturellement présent chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents. La mupirocine

produite par *P. fluorescens* NCIMB 10586, est d'une activité élevée contre *Staphylococcus aureus* et d'autres bactéries à Gram positif (El-sayed *et al.*, 2001). C'est un antibiotique largement utilisé dans les maladies tropicales (Carcanague, 1997).

1.3.2.6. Composés peptidiques (CLP)

Les CLP sont des oligopeptides courts avec une queue d'acides gras, liée produite par diverses bactéries et champignons (Raaijmakers *et al.*, 2006). Un oligopeptide court est cyclisé par la formation d'un cycle lactone entre deux des acides aminés. Cependant, la variabilité des CLP est due aux différences dans le nombre d'acides gras, la modification des acides aminés et l'organisation du cycle lactone (Raaijmakers *et al.*, 2006, 2010).

Au cours des dernières années, les CLPs ont été reconnus comme biosurfactants et représentent une activité antimicrobienne contre un large éventail de micro-organismes pathogènes, y compris les virus enveloppés, les mycoplasmes et les bactéries Gram-positives (Raaijmakers *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2013; Raju *et al.*, 2016). Les CLP des *Pseudomonas* fluorescents joueraient également un rôle actif dans la colonisation des graines (Nielsen *et al.*, 2005), des racines (Tran *et al.*, 2007), la motilité en essaimage, la formation de biofilms et la virulence (Raaijmakers *et al.*, 2010).

Les CLP produits par les *Pseudomonas* fluorescents sont de divers types et certains d'entre eux ne sont pas complètement caractérisés. Les CLP les plus étudiés appartiennent aux groupes viscosine, amphisine, tolaasine et syringomycine (Nybroe et Sørensen, 2014). Les CLP sont biosynthétisées par les peptides synthétases non ribosomiques (NRPS). Ces derniers sont des multi-enzymes géantes qui réalisent des couplages séquentiels d'acides aminés, pour générer des peptides linéaires ou cycliques (Baltz, 2014).

1.3.2.7. Cyanure d'hydrogène (HCN)

La cyanogénèse bactérienne (production de cyanure) est signalée chez certaines *Pseudomonas* fluorescents (Blumer et Haas, 2000; Zheng *et al.*, 2013; Ahemad et Kibret, 2014). Selon les facteurs environnementaux, ces bactéries produisent une quantité variable d'HCN dans la rhizosphère (Schippers *et al.*, 1990). La glycine est le précurseur métabolique immédiat du cyanure et, en présence d'

HCN synthase, elle est décarboxylée en HCN et en CO₂ (Nandi et *al.*, 2017). L'HCN synthase, un produit du groupe de gènes *hcnABC* synthase est une enzyme associée à la membrane et sensible à l'oxygène qui participe à la cyanogénèse (Devi et *al.*, 2013).

Le HCN produit par les *Pseudomonas* fluorescents a montré une toxicité contre les phytopathogènes en inhibant le cytochrome c-oxydase (Devi et Kothamasi, 2009). Néanmoins, les *Pseudomonas* fluorescents eux-mêmes sont résistants au cyanure en raison de la présence de RhsA, un thiosulfate : cyanure sulfurotransférase (rhodanèse) qui convertit le cyanure en thiocyanate moins toxique chez plusieurs *Pseudomonas* spp. (Blumer et Haas, 2000).

1.3.2.8. Sidérophores

Le fer fait partie des minéraux en vrac présents à la surface de la terre, mais il est indisponible dans le sol pour les plantes. Le fer est généralement présent dans la nature sous forme de Fe⁺³, qui est hautement insoluble ; pour résoudre ce problème les PGPRs sécrètent des sidérophores (Bhattacharya, 2010 ; Sreedevi et *al.*, 2014 Kotasthane et *al.*, 2017). Le mot sidérophore, issu du grec, signifie sidêros: fer et phore: porteur. L'utilisation des sidérophores représente chez les bactéries l'un des systèmes les plus efficaces pour l'acquisition du fer. Les sidérophores sont des composés protéiques de liaison au fer de faible poids moléculaire compris entre 200 et 2000 daltons, dont le rôle est de solubiliser, de chélater et d'extraire le fer ferrique de nombreux complexes minéraux ou organiques et de le rendre ainsi accessible aux microorganismes (Neilands, 1995).

Lorsque le fer est limité, les sidérophores microbiens fournissent aux plantes des ions de fer, améliorant ainsi leur croissance. Ces molécules agissent comme agents solubilisant du fer, à partir de minéraux ou de composés organiques, dans des conditions de limitation en fer. Une fois excrétés, les sidérophores chélatent le fer ferrique et sont ramenés sous forme de complexes sidérophore-ferrique à l'intérieur de la cellule bactérienne, où le fer ferrique est libéré du sidérophore et réduit en fer ferreux (Fe⁺²) (Chu et *al.*, 2010; Trapet et *al.*, 2016; Kumar et Sharma, 2017).

Sur la base de leurs groupes fonctionnels coordonnants du fer, de leurs caractéristiques structurales et de leurs types de ligands, les sidérophores bactériens ont été classés en quatre classes principales (carboxylates,

hydroxamates, catécholates de phénol et pyoverdines) (Crowley, 2006). Des centaines de sidérophores ont été identifiés et signalés chez des microorganismes cultivables, dont certains sont largement reconnus et utilisés par d'autres microorganismes, tandis que d'autres sont spécifiques à certaines espèces (Sandy et Butler, 2009 ; Beneduzi *et al.*, 2012; Patel et Minocheherhomji, 2018).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents produisent des sidérophores fluorescents jaune-vert appelés pyoverdines (ou pseudobactines) ayant une forte affinité pour le Fe^{3+} , avec une constante de stabilité du complexe pyoverdine ferrique vers $10^{32}M$ (Meyer et Abdallah, 1978 ; Albrecht-Gary *et al.*, 1994). Cette dernière est constituée d'une chaîne peptidique d'acides aminés liée à un chromophore fluorescent responsable de la fluorescence jaune-vert caractéristique de ce pigment (Demange *et al.*, 1987). En outre, certaines souches produisent un composé appelé ferribactine qui pourrait être un produit de dégradation ou un précurseur de la pyoverdine (Taraz *et al.*, 1991). Un autre sidérophore dérivé de l'acide salicylique est le pseudomonine produit par certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (Anthony *et al.*, 1995; Mercado-Blanco *et al.*, 2001; Trapet *et al.*, 2016). Des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents, à l'exemple de la souche *Pseudomonas fluorescens* CHA0 aux propriétés antagonistes reconnues (Duffy et Defago, 2000), produisent un sidérophore non fluorescent, la pyocheline présentant une faible affinité pour le fer (Cox *et al.*, 1981 ; Bholay *et al.*, 2012).

1.3.2.9. Enzymes lytiques

L'amélioration de la croissance par l'activité enzymatique est un autre mécanisme, utilisé par les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes. Ces dernières peuvent produire certaines enzymes, telles que les chitinases, les déshydrogénases, la β -glucanase, les lipases et les protéases...etc., qui présentent une activité hyperparasitaire, attaquant les agents pathogènes en excréant les hydrolases sur leurs parois cellulaires (Hayat *et al.*, 2010 ;Joshi *et al.*, 2012). Grâce à l'activité de ces enzymes, les *Pseudomonas* fluorescents jouent un rôle très important dans la promotion de la croissance des plantes, en particulier pour les protéger des stress biotiques et abiotiques par la suppression des champignons pathogènes tels que *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* et *Pythium ultimum* (Upadyay *et al.*, 2012 ;Nadeem *et al.*, 2013).

1.3.2.10. Induction de la résistance systémique (ISR)

Une quatrième lignée de la recherche contemporaine, sur le biocontrôle des *Pseudomonas*, peut être attribuée à des démonstrations indépendantes menées en 1991 par des groupes de recherche aux Pays-Bas, États-Unis et en Suède, que certaines *Pseudomonas* colonisant les racines protégeaient les plantes de divers agents pathogènes en induisant une résistance systémique (Weller, 2007). La résistance systémique induite (RSI) est un état de résistance active, qui dépend des barrières chimiques ou physiques de la plante hôte et qui est déclenchée par des stimuli biotiques ou abiotiques spécifiques (Tuzun, 2001 ; Senthilraja et al., 2013).

Il n'est pas facile de distinguer l'ISR de la résistance acquise systémique (SAR), car les deux utilisent des composés similaires pour supprimer les agents pathogènes. Des progrès considérables ont été réalisés pour révéler les mécanismes impliqués dans les interactions plante-PGPR-pathogène. Cependant, il existe une absence d'élucidation globale de la signalisation ISR par les bactéries. Il a été rapporté que certains composants structuraux de bactéries, tels que les flagelles, les lipopolysaccharides (LPS) et la production de sidérophores et d'antibiotiques sont les déterminants des ISR (García-Gutiérrez et al., 2012 ; Pieterse et al., 2014; Naureen et al., 2015).

D'autres produits biochimiques produits par des PGPR ont été proposés pour déclencher l'ISR; à l'exemple du dérivé de benzylamine N-alkylé produit par *P. putida*, BTP1 (Kumar et al., 2015), des composés organiques volatils (COV) produits par *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens* (Yuan et al., 2012; Pérez-García et al., 2011), du diméthylsulfure produit par *B.cereus* C1L (Meldau et al., 2013) et du DAPG produit par *P. fluorescens* CHA0 (Hernández-León et al., 2015). De plus, la résistance systémique induite implique la signalisation de jasmonate et de l'éthylène chez la plante ; ces hormones stimulent l'activation des réponses de défense contre divers agents pathogènes (García-Gutiérrez et al., 2013; Prabhukarthikeyan et al., 2018).

1.3.2.11. Solubilisation des phosphates

Le phosphore est parmi les éléments clés dans la nutrition des plantes, à côté de l'azote (N) ; il joue un rôle déterminant dans tous les processus métaboliques majeurs des plantes, notamment dans la photosynthèse, le transfert d'énergie, la transduction des signaux, la biosynthèse macromoléculaire et la respiration (Khan et

al., 2010). Il est abondamment disponible dans les sols sous forme organique et inorganique, ainsi les plantes ne peuvent pas l'utiliser tel qu'il est, car 95 à 99% se présentent sous des formes insolubles, immobilisée ou précipitée (Pandey et Maheshwari, 2007). Les plantes n'absorbent le phosphate que sous deux formes solubles : les ions monobasiques (HPO_4) et diabasiques (H_2PO_4) (Bhattacharyya et Jha, 2012 ; Gupta et *al.*, 2015 ; Tabassum et *al.*, 2017) .

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents contribuent dans la biodisponibilité du phosphore au profit des plantes, par des mécanismes de solubilisation des phosphates dans les sols par la libération de :

- Composés complexants ou dissolvants les acides organiques, les protons et ions hydroxyles.
- D'enzymes extracellulaires (minéralisation biochimique en phosphates)
- Phosphatases pendant la dégradation du substrat (minéralisation biologique en phosphate) (Shaharoon et *al.*, 2008; Sharma et *al.*,2013).

Des effets bénéfiques notables après l'inoculation de bactéries solubilisatrices de phosphates, utilisés seules ou en combinaison avec d'autres microorganismes rhizosphériques, ont été également rapportés en interaction avec diverses espèces végétales (Zaidi et *al.*, 2009 ; Maheshwari,2011 ; Gupta et *al.*,2015 ;Vejan et *al.* ,2016)

1.3.2.12. Acide Indole-3-acétique (AIA)

Les rhizobactéries peuvent produire différents types de phytohormones, notamment les auxines, les cytokinines, les gibbérellines, l'éthylène et l'acide abscissique, qui facilitent différents processus de croissance chez les plantes, comme l'élargissement et l'extension cellulaire radriculaire (Glick, 2014 ; Kaur et *al.*, 2016; Vejan et *al.*, 2016; Tabassum et *al.*, 2017).

L'acide indole-3-acétique (AIA) est une auxine synthétisée par de nombreuses PGPR, qui influence la division, l'extension et la différenciation des cellules végétales. Elle stimule la germination des tubercules, augmente le xylème et les racines latérales et adventives, contrôle les réponses à la lumière, la fluorescence, affecte la photosynthèse, la formation de pigments, la production de différents métabolites et la résistance au stress. La synthèse de l'AIA par les PGPR se produit généralement par au moins cinq voies différentes dépendantes du tryptophane,

après son exsudation par les racines (Meera et Balabaskar, 2012 ; Tabassum et *al.*, 2017; David et *al.*, 2018 ;Novo et *al.*, 2018).

1.3.2.13. Cytokinines

Les cytokinines appartiennent à une classe de phytohormones, à partir de laquelle plus de 30 composés distinctifs ont été décrits. La production de cytokinines par les PGPR est bien documentée, ayant été identifiée chez des microorganismes de différents genres bactériens, tels que *Azospirillum*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Xanthomonas* et *Pseudomonas* (Maheshwari et *al.*, 2015). De nombreux processus de développement végétale sont grandement influencés par les cytokinines, notamment la division cellulaire, la formation du système vasculaire embryonnaire, la signalisation nutritionnelle, l'expansion des feuilles, le retard de sénescence, la ramification et la production de chlorophylle (Bhattacharyya et Jha, 2012 ; Goswami et *al.*, 2016; Tabassum et *al.*, 2017; Novo et *al.*, 2018) .

1.3.2.14. 1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase

Sous différents types de stress environnementaux, tels que le froid, les courants d'air, les inondations, les infections par des agents pathogènes et la présence de métaux lourds, les plantes synthétisent le 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC), précurseur de l'éthylène (Chen et *al.*, 2007, Grichko et Glick, 2001). Une certaine quantité de l'ACC est sécrétée dans la rhizosphère et est adsorbée par les racines, qui sont ensuite convertie en éthylène. L'accumulation d'éthylène nuit à la croissance des racines, ayant comme conséquence sur l'acquisition de l'eau et des nutriments, ce qui provoque un stress supplémentaire. L'éthylène est essentiel à la croissance végétale, avec des effets différentiels sur le développement des plantes, selon sa concentration dans les tissus racinaires. Ainsi, en concentrations élevées, il induit une défoliation qui entraîne une inhibition de la croissance des tiges et des racines et une sénescence prématurée, réduisant les performances des cultures et leurs rendements (Li et *al.*, 2000).

Les PGPR ont la capacité de dégrader l'ACC dans la rhizosphère, en intervenant positivement dans ce cycle préjudiciable par l'élaboration d'un système racinaire sain nécessaire pour faire face aux stress biotique et abiotique (Wang et *al.*, 2006). L'ACC désaminase peut prévenir les effets nocifs des niveaux élevés en éthylène (Glick et *al.*, 1998) et agit sur l'ACC en le dégradant et en le convertissant

en α -kétobutyrate et en ammoniac (Glick et *al.*,1998; Mayak et *al.*,1999; Grichko et Glick, 2001; Govindasamy et *al.*, 2008; Vejan et *al.*, 2016; Patel et Minocheherhomji, 2018).

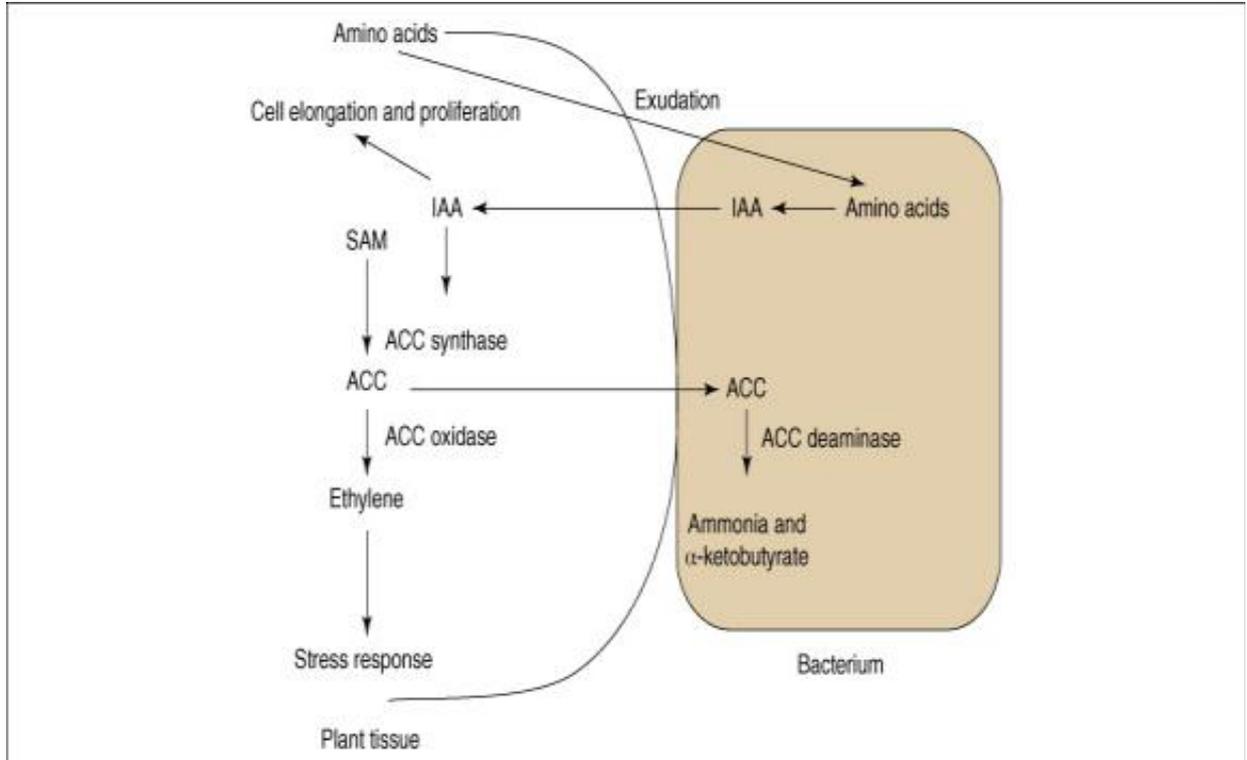


Figure I.6 : 1-aminocyclopropane-1- carboxylate (ACC désaminase) chez les PGPR (Patel et Minocheherhomji, 2018)

I.3.3. Quorum sensing (QS) et métabolisme secondaire

Sous sa forme la plus simple, le «quorum sensing» est considéré comme un mécanisme de régulation globale de l'expression génique d'une bactérie, en réponse à un seuil de densité d'une population bactérienne. Ce phénomène est possible grâce à la production et à l'accumulation de molécules dans l'environnement immédiat (Fuqua et Winans, 1994). Ces molécules, dites molécules signal, sont des composés organiques de faible poids moléculaire qui présentent une diversité fonctionnelle et chimique (Visick et Fuqua, 2005).

Suite à des stimuli environnementaux et physiologiques, les molécules signal sont synthétisées et déclenchent alors des cascades de transduction de signaux, ce qui permet aux bactéries de coordonner et de moduler l'expression de gènes cibles afin de mettre en place une réponse adaptée à leur environnement (Atkinson and

Williams, 2009). Ces systèmes de communication permettent ainsi de moduler les activités métaboliques des communautés microbiennes et leurs interactions (Yim et *al.*, 2006). Les premiers mécanismes de communication ou signalisation identifiés ont été décrits comme étant des systèmes d'auto-induction. Ce terme provient de l'observation que la bactérie est elle-même la source du signal qu'elle reçoit. Dans ces systèmes, les molécules signal déclenchent une modification de l'expression des gènes en réponse notamment aux fluctuations de la densité de la population bactérienne (Fuqua et *al.*, 1994; Visick et Fuqua, 2005).

Jadis considéré comme marginal et peu commun dans le monde bactérien, le QS est maintenant reconnu comme un mécanisme de régulation majeur chez plusieurs microorganismes. Les bactéries à Gram positif ont développé un système de communication fonctionnant avec des oligopeptides comme signaux, tandis que les bactéries à Gram négatif utilisent des molécules de faible poids pour la signalisation (Elad, et Baker, 1985 ; Fuqua et Winans, 1994 ; Benchabane, 2005; Romero et *al.*, 2011). Une famille de ces molécules fait l'objet d'une attention particulière de la part de la communauté scientifique, puisqu'elle est utilisée par un grand nombre de bactéries à Gram négatif.

Les acyles-homosérine lactone (acyle-HSL), observées pour la première fois dans le contexte de l'écologie microbienne, sont maintenant connues pour leur importance dans les relations avec les plantes, les animaux et les humains (Noga, 1996). Le QS issu des HSL joue un rôle dans plusieurs activités physiologiques, notamment la symbiose, la virulence, la compétence, la conjugaison, la production de métabolites secondaires, la motilité de type «swarming», la sporulation et la formation de biofilms bactériens (Noga, 1996 ; Bosgelmez, 2003 ; Galet, 2014).

La communication par les HSL, chez les rhizobactéries, conditionne l'expression des fonctions métaboliques et physiologiques impliquées dans leurs interactions rhizosphériques (Wood *et al.*, 1997; Rodelas *et al.*, 1993; Delorme, 2002). De plus, l'activité des rhizobactéries peut être modulée par des molécules signal émises par les plantes et la flore indigène, qui peuvent être analogues, sur les plans structuraux et fonctionnels, avec les HSL. Les mécanismes d'action invoqués pour ces molécules peuvent être un blocage du signal au niveau de la cible par mimétisme et/ou carrément une destruction des HSL (Michiko et *al.* 2003 ; Sullivan, 2004 ; Romero et *al.*, 2011).

Les propriétés antagonistes et phytostimulatrices des *Pseudomonas* spp. fluorescents, via la synthèse de métabolites secondaires, la compétence rhizosphérique et l'induction systémique de la résistance chez la plante sont sous le contrôle génétique du quorum sensing. Dans ce sens, Derek *et al.*, (1997) et Blumer et Haas (2000), ont rapporté le rôle du quorum-sensing dans la synthèse des phénazines et des cyanures d'hydrogène.

I.4. Bioformulations microbiennes phytobénéfiques

Les biopesticides microbiens comprennent des substances qui agissent contre un large éventail d'organismes nuisibles invertébrés, ainsi que contre les mauvaises herbes, les maladies des plantes et certains vertébrés. En 2017, on comptait plus de 356 principes actifs aux effets biopesticides, comprenant des insecticides, des acaricides, des nématocides, des fongicides, des bactéricides, des herbicides, des biostimulants et des promoteurs de la protection des plantes (Montesinos et Bonaterra, 2017). Parmi ceux-ci, il y a 125 principes actifs à base d'espèces/de souches de microorganismes ou de leurs métabolites pesticides, dont 57 étiquetés pour une utilisation contre des invertébrés (Arthurs et Dara, 2018).

Les biopesticides suscitent un intérêt croissant dans le monde entier en raison de leur biodégradabilité, de leur pertinence dans les programmes de lutte intégrée, et suite à la demande croissante en ces éléments biologiques (Elliott *et al.*, 1996; Gupta et Dikshit, 2010 ; Kumar et Singh, 2015). Les avantages spécifiques des biopesticides par rapport aux pesticides chimiques classiques sont surtout (Thakore, 2006 ; Ghodak *et al.*, 2017):

- Les biopesticides sont généralement moins toxiques que les pesticides chimiques conventionnels.
- Les biopesticides n'affectent généralement que l'organisme nuisible ciblé et les organismes étroitement apparentés, à la différence des pesticides classiques à large spectre pouvant affecter des organismes non ciblés, y compris l'homme.
- Les biopesticides sont souvent efficaces en très petites quantités et se décomposent rapidement, ce qui réduit les expositions et évite principalement les problèmes de pollution causés par les pesticides classiques.

- Lorsqu'ils sont utilisés dans le cadre de programmes de lutte intégrée, les biopesticides peuvent réduire considérablement l'utilisation de pesticides classiques, tout en maintenant des rendements élevés.

I.4.1 Marché des biopesticides

Ces dernières années, les biopesticides sont largement utilisés à travers le monde pour lutter contre les insectes nuisibles et les maladies. Ils présentent un des secteurs, en pleine croissance sur le marché international, qui devrait accroître sa demande prochainement.

Le marché mondial des biopesticides était estimé à 1,3 milliard US\$ en 2011 et devrait atteindre 3,2 milliards US\$ en 2017. L'Amérique du Nord a dominé le marché mondial des biopesticides, couvrant plus de 40% de la demande mondiale en biopesticides en 2011. Cette région représentait la plus grande part du marché des biopesticides microbiens en 2015, avec une valeur de 539 millions de dollars, et devrait atteindre 1,67 milliard de dollars d'ici 2022 (Markets and Markets, 2016). Le marché européen est proche des États-Unis, avec 200 millions de dollars et devrait être le marché à la croissance la plus rapide, en raison de l'adoption d'une réglementation restrictive en pesticides chimiques et de la demande croissante en producteurs biologiques. Le marché asiatique offre un grand potentiel de croissance pour les biopesticides, la Chine et l'Inde prônent plus pour l'adoption de biopesticides dans les pratiques agricoles. La production mondiale de biopesticides a été estimée à plus de 3000 tonnes par an. À l'échelle mondiale, l'utilisation de biopesticides augmente d'environ 10% chaque année. Plus de 200 produits sont vendus sur le marché américain, alors que seuls 60 produits comparables sont vendus sur le marché européen. La plupart des pays ont révisé leurs politiques afin de limiter l'utilisation de pesticides chimiques de synthèse et de promouvoir l'utilisation de biopesticides (Kumar, 2012 ; Ghodak et *al.*, 2017).

L'absence de profilage des biopesticides est l'un des problèmes majeurs pour les promouvoir comme alternative aux pesticides chimiques. Une meilleure compréhension du mode d'action des biopesticides, de leurs effets et des problèmes de réglementation peut aider à mieux promouvoir leur profil auprès des agriculteurs et ainsi leur permettre de comprendre leur contribution à la durabilité (Dubey et *al.*, 2008 ; Kumar et Singh, 2015; Ghodak et *al.*, 2017).

I.4.2. Limites des biopesticides

Dans de nombreux cas de conception de biopesticides microbiens, les résultats obtenus dans des conditions de laboratoire ou contrôlées ne sont pas facilement transférables sur terrain, en particulier lorsqu'il s'agit de bactéries à Gram négatif, non sporulantes. L'absence de formes sporales les rendent plus sensibles aux facteurs délétères survenant pendant le traitement et l'application au champ (O'Callaghan, 2016). Par conséquent, ils ont besoin de formulations protectrices appropriées pour améliorer leur efficacité sur le site cible et faciliter leur utilisation pratique chez les agriculteurs. Plusieurs auteurs ont établi des revues complètes sur le développement de formulations (Herrmann et Lesueur, 2013 ; Bashan et *al.*, 2014), en signalant le manque de formulations adéquates et la faible qualité concomitante des inoculats comme l'un des principaux obstacles à l'utilisation réussie et généralisée des bioformulations microbiennes (Stephens et Rask, 2000; O'Callaghan, 2016).

La livraison d'un nombre élevé de cellules viables à la plante est une condition préalable pour atteindre un taux de colonisation satisfaisant, ce qui améliore l'effet recherché sur le terrain. La viabilité des inoculats peut en souffrir à différents stades avant et pendant l'application. Premièrement, un produit doit afficher une durée de conservation suffisamment longue, décrivant sa stabilité tout au long du processus de production, des conditions d'emballage, de stockage et de transport (Arora et *al.*, 2016). Lors de l'application ultérieure sur le terrain, l'inoculant est confronté à d'autres facteurs préjudiciables à sa viabilité. Ceux-ci incluent les rayons UV (Zohar-Perez et *al.*, 2003), en particulier lorsqu'ils sont appliqués sur des parties de plantes hors sol, les propriétés fluctuantes du sol telles que la texture, la température et le pH (Arora et *al.*, 2016), ainsi que des cycles de séchage et de mouillage répétés en fonction des conditions climatiques et la fréquence des précipitations. Pour les inoculats appliqués directement sur les semences, la toxicité inhérente de l'enveloppe de la graine peut être nocive (Deaker et *al.*, 2012).

De plus, les interactions biotiques avec la microflore et la microfaune indigènes représentent un défi majeur pour toutes les souches appliquées. Fréquemment, le nombre de cellules d'une souche introduite diminue après l'application sur un sol naturel, car il est neutralisé par les microbes indigènes ou diminué par les prédateurs, tels que les protozoaires (Bashan, 1998 ; Arora et *al.*, 2016). De toute évidence, les facteurs de stress en pré-application survenant au cours du processus

de production exacerbent ce problème. Plus le nombre de cellules viables livrées sur le terrain est faible, moins il est probable qu'un établissement réussisse sur le site cible. Un processus de formulation adapté est donc d'une importance vitale (Berninger, 2017).

1.4.3. Conception de bioformulations microbiennes

Le succès de toute formulation dépend de l'aptitude des matières de support et de la durée de conservation du « bioagent » dans la formulation. Après tout, un matériau de support devrait fournir des conditions favorables pour des bactéries qui maintiendront une survie à long terme et amélioreront l'activité de contrôle biologique des antagonistes (Patil et *al.*, 2013). La plupart des biopesticides bactériens sont produits par une fermentation liquide, bien que la production *in vivo* et la fermentation du substrat solide aient été utilisées pour des produits de niches particulières. Une fois la fermentation terminée, les bactéries sont concentrées et formulées en produits, qui doivent avoir une stabilité durant leur stockage et être susceptibles d'une application à grande échelle. Le contrôle de la qualité est nécessaire tout au long du processus de production, pour assurer un produit final cohérent (Jackson, 2017). Des biopesticides bactériens ont été produits dans des formulations sèches, telles que poudres mouillables et granulés, ainsi que dans des concentrés liquides pour répondre à des besoins spécifiques du marché (Jackson, 2017). Il existe plusieurs techniques de séchage de microorganismes appliquées à l'échelle industrielle, à savoir l'atomisation (Bucio et *al.*, 2005; Coulibaly et *al.*, 2011), la fluidisation (Li et *al.*, 2004) et la lyophilisation (Rey, 1965 ; Perry, 1998 ; Palmfeldt et *al.*, 2003 ; Zhao and Zhang, 2005 ; Nanasombat and Sriwong, 2007; Coulibaly et *al.*, 2009).

1.4.3.1. Lyophilisation

La lyophilisation a été réalisée pour la première fois en 1890, est considéré comme l'une des plus anciennes méthodes de conservation des aliments et des herbes (Oetjen et Haseley, 2004). Cette méthode de formulation a évolué en accordant des avantages à plusieurs domaines, telles que : la conservation des produits pharmaceutiques (Garcia, 2011), la conservation de produits biologiques (Garcia, 2011 ; Stephan et *al.*, 2016) et la conservation des aliments thermosensibles (Tse-Chao Hua et *al.*, 2010).

La lyophilisation est la technique de séchage la plus répandue et la plus courante pour la conservation des micro-organismes (Morgan et *al.*, 2006 ; Liu et *al.*, 2009; Garcia, 2011; Mputu Kanyinda et *al.*, 2012). Elle est appropriée pour la production de cultures bactériennes concentrées avec l'avantage que le matériel séché peut être stabilisé et stocké à température ambiante pour de longues périodes, qui devrait aussi être facilement transportable (Palmfeldt et *al.*, 2003; Coulibaly et *al.*, 2009; Stephan et *al.*, 2016), tout en conservant l'aspect et les propriétés du produit traité (Perry, 1998). Cette technique est décrite comme la plus commode pour le séchage des *Pseudomonas* (Vidhyasekaran et *al.*, 1997; Palmfeldt et *al.*, 2003; Tse-Chao Hua et *al.*, 2010).

La lyophilisation comprend essentiellement deux étapes de traitement : la pré-congélation et la sublimation de l'eau en exposant l'échantillon à des conditions de vide poussé. La sublimation décrit la transition de phase de l'échantillon de l'état solide à l'état de vapeur et dépend de sa température et du vide environnant. En dessous d'une certaine valeur, qui dépend de la composition de l'échantillon, une transition de phases a lieu immédiatement de l'état solide (glace) à l'état gazeux sans passer par une phase liquide. L'omission de la fusion rend le processus plutôt doux et aide à maintenir les caractéristiques du produit. Le résultat final du processus de sublimation est influencé par la température de pré-congélation, la pression dans la chambre de séchage, la température d'entrée, la quantité d'échantillon, le point final du séchage et les propriétés de l'instrument. Cela implique qu'il existe d'innombrables combinaisons de paramètres de processus à évaluer lors de l'optimisation d'un protocole de lyophilisation pour un échantillon donné (Morgan et *al.*, 2006).

Les inconvénients de la lyophilisation sont les coûts élevés (Santivarangkna et *al.*, 2007) et le volume limité de cette opération par lots (Morgan et *al.*, 2006). Néanmoins, la lyophilisation est l'une des méthodes les plus fréquemment utilisées dans le développement de formulations de bactéries à l'échelle du laboratoire. Il a été évalué pour la conservation de différentes souches de *Pseudomonas fluorescens* (Jean-Noël et *al.*, 2012; Cabrefiga et *al.*, 2014; Bisutti et *al.*, 2015), *Pseudomonas* spp. (Stephan et *al.*, 2016) et des souches de *Pantoea agglomerans* (Conesa-Muñoz et *al.*, 2015).

En outre, plusieurs auteurs (Carvalho et *al.*, 2004 ; Montel Mendoza et *al.*, 2014) ont indiqué que les micro-organismes appartenant à différentes espèces et

souches peuvent présenter une sensibilité différente à la lyophilisation (Stephan et *al.*, 2016). Malgré tout, la congélation et le séchage sont connus pour leurs effets néfastes sur les différents produits biologiques (Hurst, 1977). D'où l'un des inconvénients les plus importants de la lyophilisation est la perte de viabilité (Schwab et *al.*, 2007 ; Garcia, 2011 ; Shafiei et *al.*, 2013) pendant le traitement ainsi que durant le stockage ultérieur (Potts, 1994 ; Castro et *al.*, 1995; Miyamoto-Shinohara et *al.*, 2000). En règle générale, la viabilité, par exemple, de *Pseudomonas* spp, soumis à la lyophilisation, a été réduite d'un à deux ordres de grandeur quand aucune mesure de protection n'a été prise (Stephan et *al.*, 2016).

I.4.3.2. Cryoprotection

L'addition d'agents cyroprotecteurs (CPAs) est d'une importance incontestable pour la survie des cellules bactériennes lors du processus de lyophilisation (Morgan et *al.*, 2006 ; Coulibaly et *al.*, 2010), car ils peuvent agir sur les fonctions biologiques pour préserver l'intégrité de la bicouche lipidique par le phénomène de remplacement d'eau (Coulibaly et *al.*, 2010). Ces CPAs ont deux fonctions principales pour préserver la viabilité des cellules lyophilisées : le premier est de fournir un résidu sec avec une structure physique définie agissant comme un matériau de support et comme un récepteur en réhydratation, et le second est de protéger les cellules vivantes biochimiquement contre les dommages durant la congélation et le séchage à l'air (Berny et Hennebert, 1991). Les milieux de lyophilisation couramment utilisés contiennent des solutés protecteurs.

Ces derniers peuvent être des disaccharides non réducteurs, des alcools, des sucres , des polyols (le sorbitol et le glycérol), des polysaccharides, des acides aminés (le glutamate monosodique) (Fonseca et *al.*, 2000; Fonseca et *al.*, 2001) , des protéines et des mélanges complexes (le lait écrémé) (Font de Valdez et *al.*, 1983 ; Tsvetkov et Brankova, 1983 ; Costa et *al.*, 2000), des minéraux, des sels d'acides organiques, des milieux complexes de vitamines (antioxydants) (Champagne et *al.*, 1991, Huba'lek 2003) et des macromolécules (maltodextrine) (Béal et *al.*, 2008). Cependant, la protection offerte par un additif donné au cours de ces processus varie selon les espèces de microorganismes (Font de Valdez et *al.*, 1983).

Les cryoprotecteurs sont groupés en deux classes selon qu'ils sont à l'intérieur (intracellulaire) ou à l'extérieur (extracellulaire) de la cellule:

- Cryoprotecteurs intracellulaires : ce sont des substances de faible poids moléculaire (< 100 Da) qui pénètrent à l'intérieur de la cellule. Ils sont utilisés à une concentration de l'ordre de mol/l et agissent principalement lors d'une congélation lente. Le plus important représentant de cette catégorie est le glycérol (Halliwell et Chirico, 1993 ; Bakhach et *al.*, 2007; Kawahara, 2008).
- Cryoprotecteurs extra cellulaires : ce sont des substances de haut poids moléculaire (>10000 Da) qui se concentrent à l'extérieur de la cellule. Ils sont utilisés à une concentration plus faible, de l'ordre de mmol/l, et sont indiqués lors des congélations rapides. Parmi les molécules les plus utilisées de cette catégorie se trouvent le lactose, le saccharose, le tréhalose, la maltodextrine, le dextrane et l'amidon (Palmfeldt et *al.*, 2003 ; Nanasombat et Sriwong, 2007 ; Coulibaly et *al.*, 2011).

**Chapitre II. Isolement et identification de
Pseudomonas spp. fluorescents.**

Chapitre II. Isolement et identification de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

II.1. Introduction

Le genre *Pseudomonas* (Migula, 1894), appartenant aux δ protéobactéries, à la famille Pseudomonadaceae, est l'un des plus complexes genres bactériens, il possède le plus grand nombre d'espèces (231 espèces publiées) de tous les genres de bactéries Gram-négatives (Peix, 2018). Ce genre, hautement hétérogène, a fait l'objet de plusieurs reclassements sur la base d'études phénotypiques, chimiotaxonomiques et génétiques (Palleroni, 1993 ; Anzai et al, 2000 ; Palleroni, 2015 ; Peix, 2018). Le genre *Pseudomonas* représente un groupe de bactéries cosmopolites, important pour l'environnement, dotées d'une grande polyvalence métabolique et possédant un large spectre de systèmes enzymatiques (Vasconcellos et al., 2017). Avec des besoins nutritionnels simples, ces bactéries se retrouvent quasiment dans tous les peuplements naturels : les sols, les eaux usées ou naturelles, le milieu marin et l'air (Andreani et al., 2015). Ces bactéries se retrouvent aussi dans des échantillons cliniques humains, de produits d'origine animale et de parties vivantes de plantes et d'animaux (Pascual et al., 2015) ; dont certaines espèces sont bien connues pour leur rôle bénéfique avec les plantes, d'autres en bioremédiation, tandis que d'autres sont pathogènes des plantes ou des animaux (Mulet et al., 2009; Sun et al.,2017) .

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents forment un groupe diversifié de bactéries, qui peuvent se distinguer visuellement des autres *Pseudomonas* par leur aptitude à produire un pigment jaune vert (pyoverdines) soluble dans l'eau et diffusible dans des milieux de culture pauvres en fer (Palleroni et al., 1973; Palleroni, 1984). Les saprophytes de ce groupe renferment diverses espèces non pathogènes, à cytochrome oxydase arginine dihydrolase positives et ne provoquent pas de réaction d'hypersensibilité sur le tabac. Ce groupe était représenté initialement *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. aureofaciens* (Johnson et Palleroni, 1989). Les espèces *P. fluorescens* et *P. putida* sont subdivisées, respectivement, en cinq biovars (I, II, III, IV et V) et en deux biovars (A et B). L'importance de ces deux dernières espèces est relatée dans divers environnements et sont l'objet de nombreuses études écologiques (Digat et Gardan, 1989 ; Andreani et al., 2015) .

Les travaux, portant sur les populations rhizosphériques de ce groupe rhizobactérien, ont mis en évidence l'influence de la plante et du sol sur la sélection de populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents (Latour, 1996 ; Clays–Josserand *et al.*, 1999). Il est admis, chez bactéries rhizosphériques, l'existence d'une très grande diversité spécifique et écologique, ainsi les méthodes phénotypiques utilisées pour leur taxonomie restent insuffisantes. L'étude réalisée sur des échantillons issus de différentes régions d'Algérie, a montré que la distribution des espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents et de leurs biotypes, est fonction de leur origine, et des plantes hôtes, en exerçant une influence sélective, notamment au niveau des sols cultivés et sans cultures (sols nus) (Benchabane, 2005).

Dans ce chapitre, l'effet rhizosphère a été analysé, sur les plans phénotypique et taxonomique, avec une collection de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolées à partir de quatre biotopes différents. La définition du biotope est basée sur les caractéristiques pédoclimatiques de la région et la plante hôte (la culture).

II.2. Matériel et Méthodes

II-2.1. Echantillons de sol

Les isollements bactériens ont été réalisés à partir de prélèvements de sols rhizosphériques, provenant de différentes palmeraies de régions phoenicoles et d'arbres fruitiers du sud algérien (Ghardaïa, Ouargla et Bechar). Ces régions ont été choisies sur la base de leur vocation agricole et des conditions climatiques (température élevée pouvant atteindre 49 et 50°C). Au niveau des plantes, choisies aléatoirement, la partie supérieure du système racinaire a été déterrée (profondeur de 50 à 80 cm) et le sol adhérent aux racines est récupéré, à raison de 200 à 250 g par échantillon. Les échantillons de sols, prélevés en respectant les exigences de l'asepsie microbiologique avec des outils désinfectés et stériles, sont déposés dans des sachets en papier et conservés au froid (5 °C).

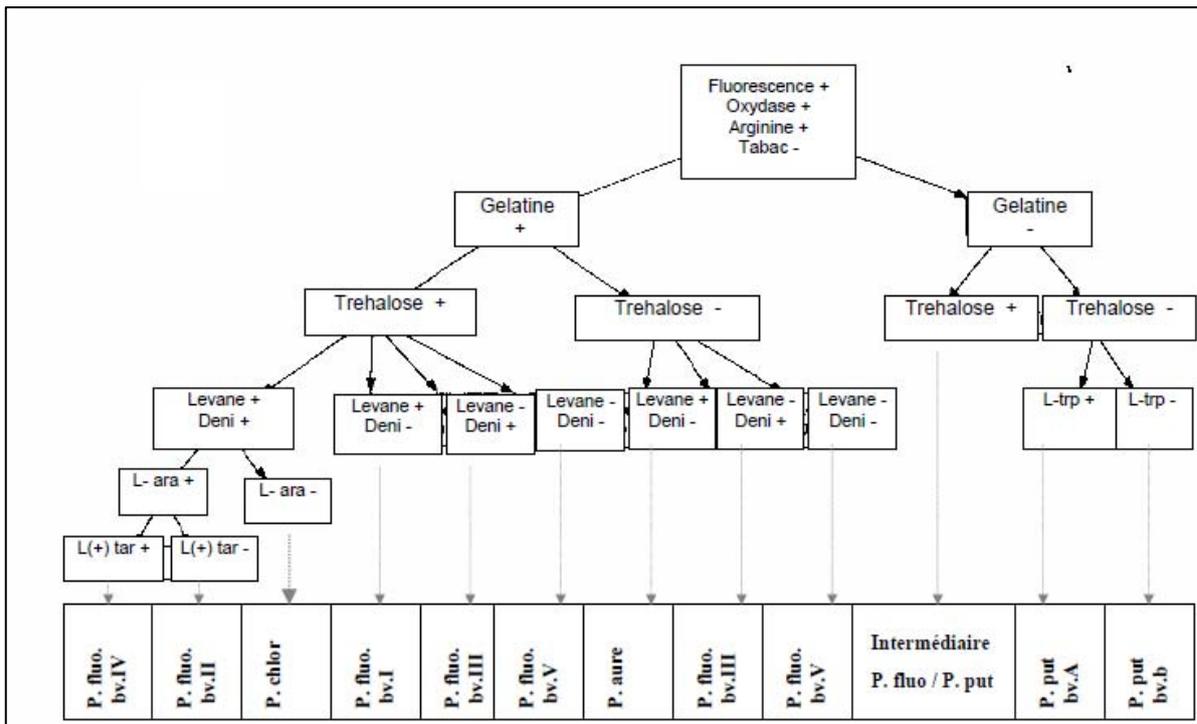
. II-2.2. Isolement des souches bactériennes

Après élimination des éléments racinaires grossiers, le sol fortement adhérent aux racines a été récupéré par rinçage dans des fioles, contenant 100 ml d'une solution tampon ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mM, pH 7), laissées 10 minutes en agitation continue avant de préparer des dilutions, de 10 en 10, pour chaque échantillon

servant aux opérations d'ensemencement sur le milieu King B (KB) (King *et al.*, 1954), additionné de chloramphénicol et d'ampicilline (0.01 ppm) (Benchabane, 2005). L'incubation a été réalisée à 25 °C pendant 24 à 48h. Les colonies bactériennes individualisées, fluorescentes sous lumière ultraviolette (350 nm), ont été sélectionnées, repiquées sur le même milieu KB additionné de glycérol (25 %) et conservées à -20 °C. De chaque biotope, nous avons pris aléatoirement trois prélèvements, soit un total de 18 échantillons (3 x6).

II-2.3. Identification taxonomique

La vérification préliminaire des caractères génériques a été effectuée selon les tests classiques décrits par Lelliot et Stead (1987) et Schaad (1988) : coloration de Gram, morphologie cellulaire, oxydase, catalase et la voie d'utilisation du glucose. Les caractérisations spécifiques et infraspécifiques ont été réalisées selon la clé dichotomique d'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes, proposée par Bossis (1995) (Figure II.1).



P : *Pseudomonas*; fluor: *fluorescens*; chlor: *chlororaphis*; aure: *aureofaciens*; put: *putida*, bv: biovar
 Trp : tryptophane, Deni : dénitrification, tar : tartrate ; ara : arabinose.
 + : réaction positive, - : réaction négative

Figure II.1 : Clé dichotomique d'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents (Bossis, 1995).

Hormis les tests où il est mentionné les conditions de culture et d'incubation, les autres tests ont été effectués avec des cultures bactériennes âgées de 18 à 24 h sur milieu KB, incubées à 25 °C. Les concentrations des suspensions bactériennes ont été déterminées par photométrie (DO), en se référant à des courbes étalons (Annexe III). Les suspensions bactériennes ont été préparées dans l'eau distillée stérile ou dans la solution tampon (MgSO₄.7H₂O 100 mM, pH 7) selon les techniques de Lelliot et Stead (1987).

➤ **Production du pigment fluorescent** : La production du pigment fluorescent diffusible a été recherchée sur milieu KBensemencé avec des cultures pures. Après incubation de 24 à 96 h à 26° C, la fluorescence est révélée sous UV (350 - 400 nm).

➤ **Test de Gram** : Les différentes étapes de la coloration de Gram sont réalisées selon la description de Gardan et Luisetti (1981). Une autre méthode, décrite par Suslow *et al.*, (1982), a été utilisée et qui consiste à déposer sur une lame deux à trois gouttes d'une solution de KOH (3 %) et on dépose une crème bactérienne de 24h. La réponse positive corrélative au Gram négatif se traduit par l'obtention d'un filet visqueux.

➤ **Arginine dihydrolase (ADH)** : Le système enzymatique dihydrolase de l'arginine permet à certains *Pseudomonas* de se développer sous des conditions anaérobiques, selon deux réactions enzymatiques : dégradation de l'arginine en citriculline (arginine desmidase) et sa transformation en ornithine (citriculline ureidase). L'hydrolyse de l'arginine est testée sur le milieu Mueller Arginine (ADH 5%). Les tubes inoculés ont été recouverts par une légère couche de vaseline et incubés à 26°C pendant 5 jours. La réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration violette suite à l'alcalinisation du milieu dû à la présence de NH₃ (Hildebrand, 1988).

➤ **Oxydase** : Une crème bactérienne de 24h est étalée sur le disque d'oxydase imbibé d'eau distillée stérile. La cytochrome oxydase se manifestant par l'apparition d'une coloration violette après 10 secondes. La réponse est positive tardive lorsqu'elle apparaît en retard (10 à 60 secondes) ; après ce temps la réponse est négative (Hildebrand *et al.*, 1988).

➤ **Test d'hypersensibilité (HR)** : Pour la réaction d'hypersensibilité sur tabac (Klement, 1963), une suspension bactérienne (10⁸-10¹⁰ cfu /ml) a été infiltrée dans le limbe foliaire de jeunes plantules de *Nicotiana tabaccum* var xanti. L'infiltration a été

effectuée par injection à l'aide d'une seringue stérile, en piquant latéralement une surface du limbe au niveau des nervures principales, qui se traduit par l'apparition d'une plage humide. Sur une autre zone de la même feuille une autre infiltration est réalisée avec de l'eau distillée stérile (témoin). Après 48 à 72 h s'il y a apparition de taches nécrotiques et formation de collapses au niveau de la zone infiltrée, la réponse est positive.

➤ **Gélatinolyse** : L'hydrolyse de la gélatine sous l'action d'une enzyme extracellulaire conduit à la libération des acides aminés. La crème bactérienne âgée de 24h a étéensemencée par piqure centrale dans des tubes à essai contenant le milieu gélatine. Après incubation à 25°C pendant 7 à 10 jours, les tubesensemencés, ainsi que les témoins nonensemencés, sont déposés au réfrigérateur (4 °C pendant 10 minutes) pour favoriser la prise du gel. La gélatinolyse se traduit par la liquéfaction du milieu (Gardan et Luisetti, 1981).

➤ **Utilisation de tréhalose** : L'oxydation des sucres conduit en aérobie à la formation d'acide pyruvique qui entraîne l'acidification de milieu. Le test d'utilisation de tréhalose est réalisé sur le milieu minéral (ARJ), additionné après autoclavage de tréhalose (5%) stérilisé à froid par filtration. Des cultures bactériennes âgées de 24h ont étéensemencées par piqure centrale et incubés à 27 °C pendant 3 à 5 jours. La réaction positive se traduit par un virage de la couleur du milieu du vert au jaune (Hildebrand *et al.*, 1988).

➤ **Levane sucrase** : Ce test, réalisé selon la technique décrite par Hildebrand *et al.*, (1988), consiste en l'ensemencement d'une jeune culture sur le milieu levane. Après incubation (27 °C, 3 jours), la présence de la levane sucrase est indiquée par l'apparition d'une culture abondante, muqueuse et brillante.

➤ **Dénitrification** : Pour certaines bactéries, la réduction des nitrates aboutit à la formation de nitrite ou bien d'azote ammoniacal. Pour réaliser le test de la réduction des nitrates, une crème bactérienne âgée de 24 h a étéensemencée sur le milieu eau peptonée nitraté. Après incubation à 27 °C pendant 5 jours, deux réactifs spécifiques A et B révélateurs de nitrates sont additionnés. Si le milieu vire au rose, la souche possède la nitrate réductase, si par contre il reste incolore même après l'ajout d'une pincée de poudre de zinc, il s'agit d'une dénitrification des nitrates (Hildebrand *et al.*, 1988).

➤ **Utilisation de L-tryptophane** : Le milieu peptoné exempt de tryptophane (riche en tryptophane) a été utilisé pour réaliser ce test. Les tubes à essais contenant le milieu

peptoné ont été ensemencés par des cultures bactériennes de 24h puis incubé à 27°C pendant 24h. La transformation du tryptophane en indole se traduit, après addition du réactif de Kovacs, par l'apparition d'un anneau rouge (Bortolotti et al., 2016).

➤ **Utilisation de l'arabinose** : Le test d'utilisation d'arabinose est réalisé sur le milieu minéral de base (ARJ), additionnée après autoclavage d'arabinose (5 %) stérilisé à froid par filtration. Des cultures bactériennes de 24h sont ensemencées par pique centrale et laissés en incubation à 27 °C pendant 3 à 5 jours. La réaction positive se traduit par un virage de la couleur du milieu du vert au jaune (Meijnen et al., 2008).

➤ **Utilisation de L-tartrate-Na**: Ce test est utilisé pour différencier entre les biovars II et IV de *Pseudomonas fluorescens*. Le test est réalisé dans des tubes à essais contenant le milieu ARJ, additionné de L-tartrate-Na (10 %) stérilisé à froid par filtration. Les tubes sont ensemencés par pique centrale avec une crème bactérienne âgée de 24 h et incubés pendant 3 à 5 jours à 27 °C. L'utilisation de ce substrat se traduit par l'alcalinisation du milieu qui vire de vert au bleu (Digat et gardan, 1987).

➤ **Activité pectolytique**: Des tubercules de pomme de terre, lavés et essuyés, sont désinfectés par trempage (10 mn) dans une solution d'éthanol (70 %). Après rinçage à l'eau distillée stérile, les tubercules sont découpés en tranches (1-2 cm d'épaisseur) et déposés dans des boîtes de Pétri dans de l'eau physiologique stérile. Trois gouttes d'une suspension bactérienne préparées après 24 h de culture, sont déposées sur les tranches. Après 7 à 14 jours, la réaction est considérée positive avec l'apparition de pourriture qui s'accompagne d'une forte odeur (Cooksey et al., 1990).

II.2.4. Sélection et caractérisation des souches

Les caractérisations phénotypiques et génotypiques ont été réalisées avec une collection de souches sélectionnées sur la base de leur activité antagoniste *in vitro*, à titre de test préliminaire, vis à vis de deux champignons phytopathogènes: *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercisi* et *Fusarium oxysporum* f.sp *albedenis*.

II.2.4.1. Sélection des souches antagonistes

L'activité antagoniste *in vitro* a été évaluée à travers l'inhibition de la croissance mycélienne des deux isolats fongiques de sur le milieu KB (King et al., 1954). La

pureté des isolats fongiques a été vérifiée après repiquage sur le milieu gélosé PDA (Annexe I).

Les tests d'antagonisme ont été réalisés sur les milieux de culture KB, PDA et le milieu mixte (KB-PDA : ½, ½) (Annexe I) selon la méthode de Becker et Cook (1988). Des disques (ϕ 5 mm) de papier Whatman, tapissés d'une crème bactérienne d'une culture de 24 heures, ont été déposés à la périphérie de la boîte de Pétri contenant le milieu de culture. Après 24 heures d'incubation à 25 °C, une pastille (ϕ 5 mm) "milieu solide" de l'isolat fongique a été déposée au centre de la boîte. Cet essai a été réalisé en deux étapes : (i) Une première étape préliminaire où l'isolat fongique a été confronté aux quatre souches de *Pseudomonas* en même temps. Les observations ont porté sur l'existence ou l'absence d'une inhibition de la croissance mycélienne, comparativement à la croissance des témoins dans les trois milieux de culture utilisés. (ii) Dans la deuxième étape, chaque souche bactérienne, ayant montré une activité antagoniste notable, a été confrontée seule avec l'isolat fongique, dans une disposition en deux spots bactériens aux extrémités opposées de la boîte et l'isolat fongique au centre. L'activité antagoniste a été faite notée après 8 jours d'incubation à 25°C, en mesurant la croissance mycélienne (diamètre moyen de la colonie fongique).

II.2.4.2. Caractérisation des profils trophiques

Les opérations de caractérisation sont réalisées au niveau du laboratoire spécialisé en microbiologie (BCCM/LMG, GENT Belgique ; Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, Laboratory of Microbiology). La caractérisation phénotypique, via l'étude des profils trophiques, a été réalisée avec 15 souches bactériennes issues des différents biotopes (Tableau II.1).

L'identification des bactéries isolées a été effectuée avec le test GENIII-MicroPlate™ du système «BIOLOG». Ce système permet de vérifier simultanément diverses réactions métaboliques : 94 réactions phénotypiques ; 71 sources de carbone et 23 tests de sensibilité aux inhibiteurs chimiques. En plus, il détermine d'autres propriétés physiologiques importantes : le pH, la tolérance au sel et à l'acide lactique, le pouvoir réducteur et la sensibilité chimique.

Les souches ont été cultivées pendant 24 h à 33 °C sur le milieu spécial (agar Biolog Universal Growth) additionné de sang (BUG + B). La suspension bactérienne doit avoir une transmittance de 90 à 98 %. 100 μ l microlitres de suspension bactérienne ont été utilisés pour inoculer les microplaques. La densité optique (595

nm) est mesurée après 48 h d'incubation à 25 °C, à l'aide du lecteur automatique de microplaques (Bio-Rad modèle 550).

Tableau II. 1 : Nombre et Origine des souches bactériennes retenues

Souches	Biotopes	Origine
BB6, BB10, BB2, BB9	Palmier dattier	Bechar (Beni Abbas)
BT3, BT7, BS4	Palmier dattier	Bechar (Taghit)
F8, F20, F21, F23	Palmier dattier	Ouargla
F19, F27, F48	Tomate	Ghardaïa
PI9, PI11	Poirier	Ghardaïa
GP4	Pommier	Ghardaïa

L'identification des bactéries, par le système Biolog, est réalisée avec le lecteur de plaque jumelé à une base de données informatisée des profils de bactéries de référence. L'utilisation des substrats ou la résistance aux inhibiteurs chimiques se traduisent par l'apparition dans les puits d'une couleur pourpre, produite par la réduction de l'indicateur, le tétrazolium, en un composé coloré le formazan. En l'absence de l'utilisation du substrat ou si la bactérie est sensible au produit, les puits demeurent incolores. Les résultats ont été interprétés selon les instructions du fabricant (Biolog Inc., Californie, États-Unis).

Une analyse, par groupe de résultats, a été réalisée à l'aide du coefficient de Bray-Curis et de l'UPGMA avec le logiciel BioNumerics (Applied Maths, Belgique). L'identification est donc réalisée en jumelant le profil de la bactérie à identifier à celui de l'espèce bactérienne présentant le plus de similarité. L'identification s'appuie principalement sur deux valeurs:

- La similarité : un indice reflétant le degré d'appariement entre le profil métabolique de la bactérie à identifier et celui de la bactérie proposée par le système Biolog. Plus la valeur se rapproche de 1, meilleure est considérée l'identification.

- La distance : indique le nombre de puits dont les résultats sont différents entre la bactérie inconnue et celle proposée par le système Biolog. Plus cette différence se rapproche de zéro, meilleure est considérée l'identification.

II.2.4.3. Séquençage de l'ADNr 16S et étude phylogénétique

En plus de l'identification basée sur le système BIOLOG, un séquençage partiel de l'ADNr 16S a été réalisé. La pureté des cultures bactériennes a été vérifiée sur milieu TSA à 28 °C (BBL 11768), avant d'entamer les différentes étapes suivantes.

Extraction de l'ADN : L'ADN a été préparé selon le protocole de Niemann et al., (1997). L'extraction de l'ADN se fait sur un échantillon de 1,5 ml prélevé dans les fioles de culture (2 répétitions/souche). L'échantillon est centrifugé et le culot est lavé à l'eau peptonée. Les cellules sont lysées (lyzosyme, 20 mg/ml) et de protéinase K (20 mg/ml). Le culot est repris et les étapes suivantes sont celles définies par le kit d'extraction (*Kit Wizard® Genomic DNA Purification*, Promega). L'ADN extrait est lavé à l'éthanol 70%, éliminé par séchage sous hotte et ADN est remis en suspension dans de l'eau milliQ autoclavée. Cet ADN peut être stocké à 4°C (ou à -20°C pour une plus longue période).

➤ **Vérification de l'intégrité de l'ADN** : L'intégrité de l'ADN extrait est vérifiée à l'aide d'un spectrophotomètre, après balayage entre 200 et 400 nm. Le résultat est une courbe qui est caractéristique dans le cas d'un ADN intègre. Si la courbe obtenue pour l'échantillon diffère de cette courbe type, l'ADN n'est pas de bonne qualité (Figure II.2).

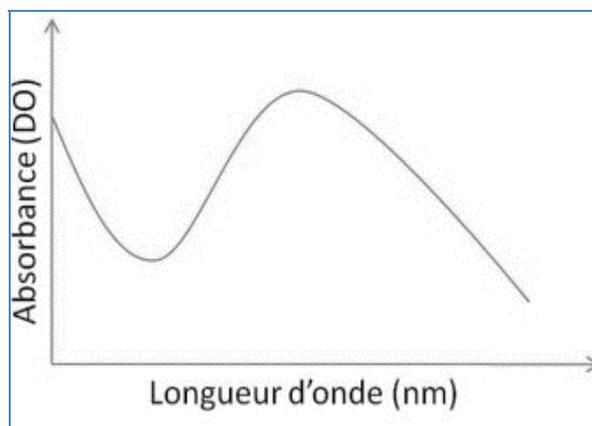


Figure II.2 : Courbe caractéristique d'un ADN intègre

Les rapports des DO obtenues, pour les longueurs d'onde 260 nm et 280 nm, permettent de calculer les facteurs d'intégrité : si ce facteur est supérieur à 1,7 l'intégrité des ADN est bonne et les étapes suivantes peuvent être entamées. La concentration de l'ADN extrait (ng/µl) peut être obtenus à partir de la DO ($DO_{260nm} * 50 * dilution$).

➤ **Amplification du gène 16S**

L'ADN ribosomique 16S est amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction), en utilisant deux amorces :

Nom (a)	Séquence synonymique (5' -> 3')	Position (b)
16F27 pA	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	8-27
16R1522 pH	AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA	1541-1522

(a) F : amorce directe / R : amorce inverse

(b) Position d'hybridation faisant référence à la numérotation des séquences du gène de l'ARNr 16S de *E. coli*.

1µl d'ADN génomique obtenu est amplifié dans 25 µl de mixture réactionnelle, contenant tous les réactifs nécessaires pour l'amplification PCR (Tableau II.2).

Tableau II.2 : Réactifs utilisés pour l'amplification PCR

Réactifs	Concentration de la solution mère	Concentration de travail	V (µl) utilisé pour une réaction
Buffer KCl – MgCl ₂	10X	1X	2,5
MgCl ₂	25 mM	2 mM	2
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5
16SP0	10 µM	0,5 µM	1,25
16SP6	10 µM	0,5 µM	1,25
Taq polymérase	5 U/µl	0,625 U/25 µl	1
H ₂ O PCR	-	-	15,5
V total (µl)	-	-	25

Le programme d'amplification est lancé sur le thermocycleur: 5 minutes à 95°C, 25 cycles comprenant : 30 secondes à 95°C, 30 secondes à 55°C, 2 minutes à 72°C, suivis de 10 minutes à 72°C. Une fois le programme terminé les échantillons sont conservés à 4°C.

➤ **Vérification de la spécificité de l'amplification**

Les produits PCR ont fait l'objet d'une électrophorèse sur gel d'agarose (1%), additionné de bromure d'éthidium (BET). 100 mg d'agarose en poudre sont ajoutés à

100 ml de tampon TAE 1X (Tris Acétate-EDTA ; Euromedex). Cette solution est homogénéisée par ébullition (micro-onde, 3min) avant d'être coulé dans une plaque d'électrophorèse horizontale. Un marqueur de poids moléculaire est aussi chargé sur le gel pour vérifier que la bande recherchée (1500 bp) est bien retrouvée dans les échantillons amplifiés. La migration s'effectue dans le tampon TAE 1X à 100 V pendant environ 30 minutes. Le gel est visualisé par la suite par un transilluminateur (gel Doc XR) piloté avec un ordinateur.

➤ **Purification du produit PCR** : L'ADNr 16S amplifié par PCR a été purifié en utilisant le kit de nettoyage PCR NucleoFast® 96 (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Les produits purifiés sont stockés à 4°C, en attendant le dosage.

➤ **Dosage des produits PCR purifiés** : Le dosage des produits PCR purifiés est réalisé sur gel d'agarose (1%). Les paramètres utilisés pour la migration sont identiques à ceux décrits précédemment. Les produits purifiés sont chargés sur le gel, ainsi que le marqueur de poids moléculaire. La détermination des concentrations se fait en comparant l'intensité de la bande à 1500 pb de chaque échantillon à celle de la bande correspondante pour le marqueur de poids moléculaire. Si l'intensité est 2 fois plus importante pour l'échantillon, la concentration de celui-ci sera deux fois plus importante que pour le marqueur de poids moléculaire (MPM).

➤ **Séquençage du gène 16S** : Les réactions de séquençage ont été réalisées en utilisant le kit de séquençage Cycle BigDye® et purifiées avec le kit de purification BigDye® X TerminatorT. Le séquençage a été effectué en utilisant l'analyseur génétique ABI Prism® 3130XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Les amorces directes et inverses suivantes ont été utilisées pour obtenir un chevauchement partiel des séquences, assurant des données assemblées très fiables :

- Pour 1D14041-à ID14045: gamma, * gamma, BKL1
- Pour 1D14047, 1D14050, 1D14052 et 1D14054: gamma, * gamma, BKL1, 3

Nom (a) Séquence synonymique (5' -> 3') Position (b)

16F358 * Gamma	CTC CTA CGG GAG GCA GCA GT	339-358
16R339 Gamma	ACT GCT GCC TCC CGT AGG AG	358-339
16R519 BKL1	GTA TTA GCC CGG CTG CTG GCA	536-516
16R1093 3	GTT GCG CTC GTT GCG GGA CT	1112-1093

(a) F : amorce directe / R : amorce inverse

(b) Position d'hybridation de référence à la numérotation des séquences du gène de l'ARNr 16S de *E. coli*.

➤ **Traitement des séquences** : L'assemblage des séquences a été réalisé en utilisant le logiciel Bio Numerics (Applied Maths, Belgique). Une matrice de similarité a été créée en utilisant le même logiciel pour le calcul d'homologie avec une pénalité d'écart nulle (0 %) et après élimination des bases inconnues. L'analyse phylogénétique a été réalisée après inclusion de la séquence consensus dans un alignement de petites séquences de sous-unités ribosomiques collectées à partir de la banque de séquences nucléotidiques internationale **EMBL** (European Molecular Biology Laboratory, www.embl.org).

Un arbre phylogénique a été construit en utilisant la méthode phénétique NJ (neighbour-joining) pour établir des regroupements entre espèces par une matrice des distances. Ces dernières sont calculées en rapportant le nombre de sites variables par comparaison des séquences. La validation de cette méthode est établie par le test de robustesse (bootstrap) qui traite le résultat de 1000 analyses en Neighbour-Joining (Felsenstein, 1985).

II .3. Résultats

II.3.1. Isolement des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents

Les méthodes de caractérisation ont permis une identification préliminaire des isolats issus des biotopes étudiés (Tableau II. 1). La sélection initiale a permis de constituer une collection de 242 souches bactériennes fluorescentes. Les tests de l'oxydase et de l'arginine-dihydrolase, considérés comme des tests déterminatifs dans l'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents (Bossis, 1995), ont été pratiqués sur les 242 souches. L'étude des cytochromes respiratoires a permis de distinguer *P. aeruginosa* des autres espèces saprophytes ayant une cytochrome C oxydase (Stanier *et al.*, 1966) et de la plupart des espèces phytopathogènes dépourvues de cette enzyme (Lelliot *et al.*, 1966; Sands *et al.*, 1967; Palleroni, 1984). Le test de l'hypersensibilité (HR) a permis de discriminer davantage les saprophytes des phytopathogènes, lesquels provoquent une réaction d'hypersensibilité (Klement, 1963).

Les résultats ont permis de retenir 100 souches [oxydase (+), arginine (+) et tabac (-)], apparentées à des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes, soit un taux de 41,32% du total des souches isolées. La répartition des souches selon les quatre biotopes, montre une dominance des souches issues des palmeraies (70 %).

A partir du biotope des poiriers, 15 souches ont été isolées, suivi de près par les 11 isolats du biotope de tomate et 4 isolats du biotope pommier (Tableau II.3).

Tableau II.3 Répartition des souches isolées selon les biotopes

Biotopes	Souches Isolées	Souches fluorescentes identifiées
Palmier dattier (<i>Phenix dactylifera</i>)	155 (64,04 %)*	70 (70 %)
Pommier (<i>Malus pumila</i>)	22 (09,09 %)	4 (4 %)
Poirier (<i>Pyrus communis</i>)	45 (18,59 %)	15 (15 %)
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	20 (08,26 %)	11 (11 %)
Total	242	100 (41.32)%

* Pourcentage par rapport au nombre total de souches sélectionnées (n = 242).

II-3.2. Identification spécifique

Les caractères physiologiques et biochimiques des isolats bactériens, selon les réactions obtenues dans les tests discriminatifs proposés par **Bossis (1995)**, ont permis de regrouper la grande partie des souches en quatre espèces principales : *Pseudomonas fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens* et *P. putida*. Les souches qui ne correspondent pas aux profils des espèces citées sont regroupées au sein du groupe intermédiaire entre *P. putida* et *P. fluorescens* (Tableau II-4). Les résultats montrent une nette dominance de l'espèce *P. fluorescens* (52 souches), suivie par *P. putida*, (24 souches) et 20 souches appartenant au groupe intermédiaire. En ce qui concerne les deux espèces de *P. chlororaphis* et *P. aureofaciens*, chacune est représentée par deux souches.

Tableau II.4. : Identification spécifique des souches

	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. fluorescens-putida*</i>	<i>P. chlororaphis</i>	<i>P. aureofaciens</i>
Nombre et (taux)	52 (52 %)	24(24%)	20 (20 %)	2 (2 %)	2 (2 %)

P : *Pseudomonas* ; *Groupe intermédiaire entre *P. putida* et *P. fluorescens*

II-3.3. Identification infraspécifique

Les caractérisations spécifiques et infraspécifiques ont permis d'observer dix spectres de réponses, correspondant aux taxons et subdivisions des *Pseudomonas* spp. fluorescents (Tableau II.5).

Chez *P. fluorescens* (52 souches), le biovar III, reconnu par ses réactions gélatine (+), tréhalose (+/-), levane (-) et dénitrification (-), est de loin le plus dominant avec 45 souches (86,53%). Les 7 souches restantes se répartissent dans les autres biovars: biovar V (4 = 7,69 %), biovar IV (2 = 3,84 %) et biovar II (1= 1,92%).

Sur les 24 souches affiliées à *P. putida*, selon le test d'utilisation du L-tryptophane, 23 souches appartiennent au biovar (A) et une seule souche du biovar (B) (Tableau II.5).

Tableau II.5 : Spectres de réponses d'identification spécifique et infraspécifique

Spectres	Spectres des réponses									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nombre de souches	20	23	4	1	23	22	2	1	2	2
Tests										
Fluorescence	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tabac	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gélatine	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Tréhalose	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
Levane sucrase	nt	nt	-	nt	+	+	+	+	-	+
Dénitrification	nt	nt	nt	nt	nt	nt	-	+	nt	+
Arabinose	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	-	nt	+
L ⁺ Tartrate Tryptophane	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
	Intermédiaire	P p. bv. A	P f. bv. V	P p. bv. B	P f. bv. III	P f. bv. III	P . chlor.	P f. bv. II	P .aureo	P . f bv IV

nt : non testé Pf : *Pseudomonas fluorescens* ;

Pf : *Pseudomonas putida* ; bv : biovar

II.3.4. Distribution des souches selon les biotopes

La répartition des souches (biovars) selon la plante hôte montre que, quel que soit cette dernière, le biovar III est présent, et toujours prédominant, à l'exception du pommier où la prédominance revient à l'espèce *Pseudomonas putida* bivar A.

Selon les résultats mentionnés dans le **tableau II.6**, le plus grand nombre de souches isolées provient du sol cultivé en palmier dattier (70 souches) quel que soit le biovar. Tous les taxons des *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été retrouvés que dans les isollements issus des biotopes de Palmeraie.

Concernant les deux espèces de *Pseudomonas chlororaphis* et *Pseudomonas aureofaciens*, on note une absence commune au niveau des cultures du pommier et de tomate, alors que cette absence est enregistrée seulement pour l'espèce *Pseudomonas Chlororaphis* chez le poirier. En revanche, ces deux espèces existent chez le palmier dattier mais qui reste faible.

Tableau II-6 : Répartition des souches selon la plante hôte.

Espèces	Plantes hôtes			
	Palmier dattier	Pommier	Poirier	Tomate
<i>P. fluorescens</i>				
Biovar II	1	0	0	0
Biovar III	27	1	8	9
Biovar V	3	0	0	1
Biovar IV	2	0	0	0
<i>P. putida</i>				
Biovar A	17	2	4	0
Biovar B	2	0	0	0
Autres espèces				
<i>P. fluorescens/putida</i>	15	1	2	1
<i>P. chlororaphis</i>	2	0	0	0
<i>P. aureofaciens</i>	1	0	1	0
Total	70	4	15	11

En résumé, *P. fluorescens* est toujours l'espèce la plus fréquemment isolée (52%), suivi du *P. putida* (23%). Le biovar III prédomine dans l'ensemble et spécifiquement au niveau de quatre biotopes 45% (Figure II.3).

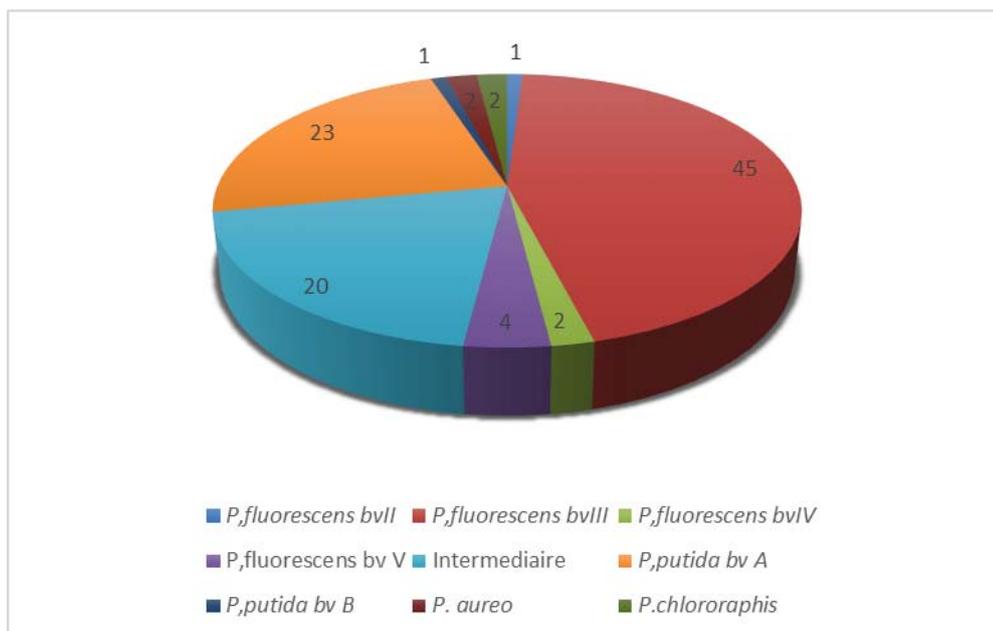


Figure II.3 : Répartition spécifique et infra spécifique des souches selon les biotopes.

II.3.5. Essai d'antagonisme *in vitro*

L'activité antagoniste *in vitro*, vis à vis des deux agents phytopathogènes (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) et *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedenis* (Foa), a permis d'observer 9 spectres de réponses selon leur l'intensité. La croissance mycélienne enregistrée chez les témoins a été nettement supérieure à celle des interactions *Pseudomonas*-isolat cryptogamique. Cette activité est plus importante vis-à-vis de Foa comparativement à Fol. D'après les spectres de réponses, 22 souches ont inhibé la croissance mycélienne des deux agents pathogènes (Tableau II.7).

L'activité antagoniste des différentes souches de *Pseudomonas* est variable vis-à-vis des agents phytopathogènes. Toutes les souches sont antagonistes au moins à l'encontre d'un agent fongique. Le taux d'inhibition le plus important a été enregistré avec PI9 (59.33%) vis à vis de foln et E39 et F27 (67.33%) vis à vis de la même souche (E39) (Tableau II.8).

Chapitre II : Isolement et identification de *Pseudomonas* spp. fluorescents

Tableau II.7 : Activités antagonistes *in vitro*

Souches	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i>
BS4,F8,F19,F20,F21,F22,F23,F27,F42;F43,F44, F45,F48,GP4,BT3,BT7,PI9,PI11,BB2,BB6,BB9,BB10	+++	+++
F24,F25,F41,PI12,F46	+++	++
BS3,F15,F16,F18,F28,F29,F30,F32,F33,F40,BS7, GP3,BT2,BT4,BT5,BT13,PI5,PI6,PI7,PI8,BB5,BB7,BB11	++	+++
F17,BS6,GP1,BT9,PI1,PI2,PI3,PI10	+	+++
BS1,BS2,F1,F2,F5,F9,F10,F11,PI13	-	+++
BS5,F14,F26,F47;GP2,BT12,PI4,PI15,BB1,BB3,BB4,BB8,BB12 BB13,BB14,BB15,BB16,BB17,BB18,BB19,BB20,BB21,BB22	++	++
BT1,BT8	+	++
F6,F7,F12,BT10,BT11,PI14	-	++
F4,F13	-	+

+++ Très forte activité ++ moyenne activité + faible activité - : absence d'activité

Tableau II.8 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des agents fongiques.

Souches	Taux d'inhibition (%)					
	Foa	Fol	Foln	Pyt	E39	Ggt
BB6	28,97 (± 0,38)*	43,75 (±1,25)*	39,33 (±2,31)*	24,50 (±2,18)*	29,83 (±0,29)*	42,67 (±1,15)*
F21	31,76 (±2,04)*	42,92 (±0,72)*	22,67 (±1,15)*	25,67 (±0,58)*	17,33 (±1,15)*	12,67 (±1,15)*
F23	42,92(±0,72)*	39,58 (±0,72)*	42,67 (±1,15)*	20,67 (±1,15)*	19,33 (±1,15)*	41,50 (±0,50)*
BB10	25,87 (±2,04)*	47,50 (±1,25)*	14,67 (±1,15)*	14,00 (±2,00)*	46,00 (±2,00)*	24,00 (±2,00)*
BT7	35,93 (±0,55)*	36,67 (±0,72)*	39,67 (±1,53)*	00,00 (±0,00)*	34,00 (±2,00)*	44,00 (±2,00)*
BB9	40,00 (±2,17)*	27,84 (±0,68)*	44,33 (±0,58)*	32,00 (±2,00)*	38,67 (±1,15)*	47,33 (±2,31)*
PI11	36,07 (±2,45)*	40,83 (±1,44)*	37,67 (±0,58)*	12,00 (±2,00)*	24,67 (±1,15)*	41,33 (±2,31)*
PI9	28,23 (±1,18)*	42,92(± 0,72)*	59,00 (±1,00)*	34,67 (±1,15)*	59,33 (±1,15)*	48,67 (±1,15)*
F48	40,44 (±1,40)*	38,75 (±1,25)*	51,33 (±1,15)*	4,33 (±0,58)*	34,67 (±1,15)*	35,67 (±0,58)*
F27	34,26 (±0,89)*	29,58 (±1,44)*	31,67 (±0,58)*	7,33 (±0,58)*	67,33 (±1,15)*	30,67 (±1,15)*
F20	34,58 (±0,72)*	39,17 (±0,72)*	39,67 (±0,58)*	31,33 (±1,15)*	42,67 (±1,15)*	49,33 (±1,15)*
F19	36,07 (±1,36)*	35,83 (±1,44)*	22,00 (±2,00)*	0,00 (±0,00)*	40,67 (±1,15)*	00,00 (±0,00)*
F8	30,83 (±0,72)*	40,83 (±0,72)*	29,33 (±1,15)*	27,33 (±1,15)*	59,67 (±0,58)*	24, 67 (±1,15)*
GP4	26,25 (±2,17)*	25,83 (±0,72)*	26,67 (±2,31)*	17,33 (±1,15)*	21,33 (±1,15)*	40,33 (± 0,58)*
BT3	32,75 (±1,80)*	42,92(± 0,72)*	15,67 (±0,58)*	24,67 (±1,15)*	53,33 (±2,31)*	27,33 (±1,15)*
BB2	32,08 (±0,72)*	42,92(± 0,72)*	0,00 (± 0,00)*	21,67 (±0,58)*	0,00 (±0,00)*	42,00 (±2,00)*
BS4	31,25 (±1,25)*	37,92 (±0,72)*	20,67 (±1,15)*	24,67 (±1,15)*	31,33 (±1,15)*	31,33 (±1,15)*

Foa : *Fusarium oxysporum*f.sp *albedinis* ; Fol: *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ; Foln : *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini*; Pyt : *Pytium ultimum* ; GGt : *Gaymanomyces graminis* var *tritici* ; E39: *Eutypa lata*. . * : Ecart type de trois répétitions

II.3.4. Caractérisation des profils trophiques (BIOLOG)

Les résultats du test de microtitration (BIOLOG GENIII) (Annexe II) réalisé avec quinze souches antagonistes (Figure II.4), montrent que:

- Les souches ID14054(BT7), ID14055(F21), ID14053(BT3), ID14043(F20), ID14044(F23), ID14046(F48) et ID14050(BS4) sont affiliés à *Pseudomonas fluorescens* biotype C. avec respectivement des similarités significatives de 0.694, 0.757, 0.694, 0.764, 0.763, 0.721 et 0.841.
- Les souches ID14048 (BB10) et ID14045 (F27) sont identifiées comme étant *Pseudomonas fluorescens*, mais sans biotypage (similarité faible de 0.252 et 0.400).
- Les souches ID14041(F8), ID14047(BB6), ID14042(F19) et ID14052 (PI11) ont été identifiées comme étant *Pseudomonas mendocina* avec respectivement des similarités significatives de 0.700, 0.619 et 0.514.
- La souche ID14051(PI9) a été identifiée comme étant *Pseudomonas* sp (0.475). La souche ID14049 (GP4) a été affiliée à *Pseudomonas putida* biotype B (0.444).

II.3.5. Séquençage de l'ADNr 16S et étude phylogénétique

L'amplification de l'ADNr des isolats de *Pseudomonas* a révélé l'apparition des bandes similaires pour l'ensemble des isolats avec une taille approximative de 1500 paires de bases (Figure II.5).

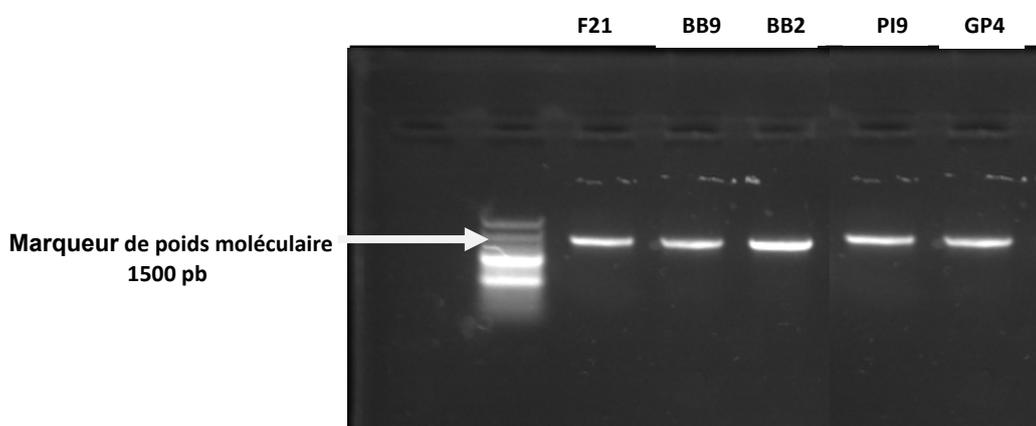


Figure II.5 : Gel reprenant les 5 ADN amplifiés et le marqueur de poids moléculaire

Les séquences ADNr 16S isolats ont été directement déterminés à partir des produits PCR dans les deux sens (reverse et forward), par Genome-Express. Les alignements ont été effectués, le programme BLAST de la banque de données NCBI ([National Center for Biotechnology Information \(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) (Annexe II).

Une similarité significative (> 98,7%) est observée avec plusieurs espèces validées des sous-groupes de *P. gessardi* et *P. fluorescens* (Figure II.6), indiquant :

- Les souches 1D14054 (BT7), ID14043 (F20), ID14044, (F23) et ID14050 (BS4) appartiennent à l'une de ces espèces (*P. gessardi* et *P. fluorescens*).
- La souche ID14045(F27) a été identifiée comme *P. fluorescens*.
- Les souches ID14047(BB6), ID140152(PI11), ID14041(F8) et ID14042 (F19) ont été identifiées comme étant *P. putida*.

L'analyse phylogénétique des *Pseudomonas* étudiés permet de positionner chaque isolat et sa corrélation génétique avec les autres souches les plus proches, existant dans la banque NCBI. Cette analyse a permis de rapprocher les isolats étudiés aux deux groupes de *Pseudomonas* (*P. putida* et *P. fluorescens* / *P. gessardi* subgroup). Les résultats obtenus par approche moléculaire en comparant avec les

résultats phénotypiques obtenus (clé dichotomique et Biolog GENIII) révèlent la complexité et la variabilité au niveau des différentes espèces (Tableau II 8).

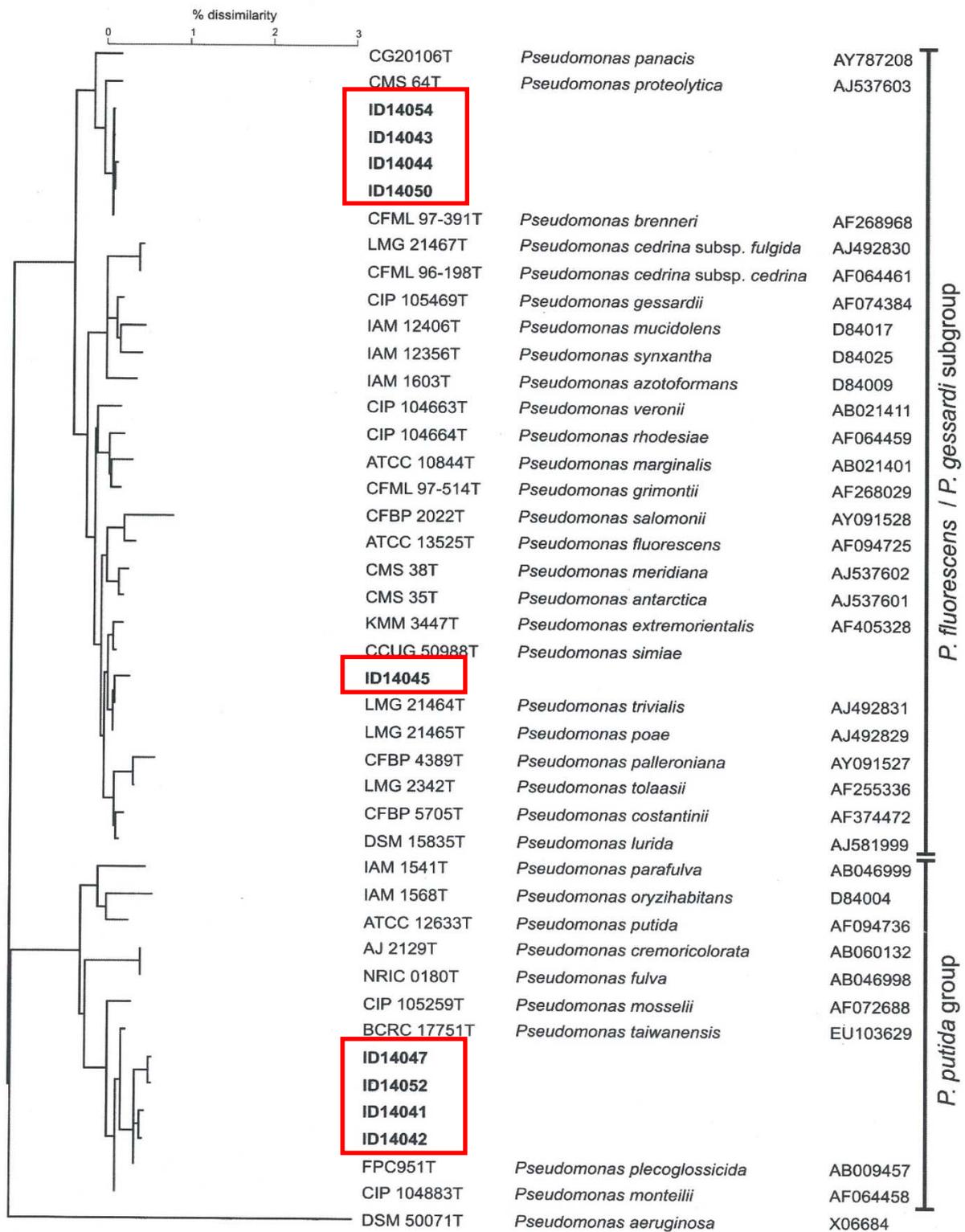
L'identification génétique des six souches qui ne figurent pas sur l'arbre phylogénétique (BB9, PI9, GP4, F21, *BB2* et BB10) (Tableau II. 8), montre que :

- GP4 a été affiliée à *Pseudomonas* sp (96%).
- PI9 et BB2 ont été identifiées comme étant *Pseudomonas putida*/*Pseudomonas monteilli* (99%).
- BB9 a été affiliée à l'espèce *Pseudomonas putida* (96%).
- F21 a été affilié à *Pseudomonas* sp, *P. fluorescens* ou *P. veronii* (94%)
- BB10, bien que les résultats de la PCR sont de mauvaise qualité, les résultats du BIOLOG (faible similarité de 0.400) et l'identification classique l'ont identifié comme étant *P. fluorescens*.

Tableau II.9 : Identification comparative (Biolog GENIII et l'ADNr 16S)

N°	Biolog GEN III		l'ADNr 16S	
	identifié	Similarité	identifié	Similarité
BT7	<i>P. fluorescens</i> biotype C	0.694	<i>P.gessardi</i> / <i>fluorescens</i> sgpe	> 98.7
F21	<i>P. fluorescens</i> biotype C	0.757	<i>P.sp/P.fluorescens</i> / <i>P.verronii</i>	/
BT3	<i>P. fluorescens</i> biotype C	0.694	ND	/
F20	<i>P. fluorescens</i> biotype C	0.764	<i>P.gessardi</i> / <i>fluorescens</i> sgpe	> 98.7
F23	<i>P. fluorescens</i> biotype C	0.763	<i>P.gessardi/ fluorescens</i> sgpe	> 98.7
F48	<i>P. fluorescens</i> biotype C	0.721	ND	/
BS4	<i>P. fluorescens</i> biotype C	0.841	<i>P.gessardi/fluorescens</i> sgpe	> 98.7
F27	<i>P. fluorescens</i> sous / groupe	0.252	<i>P. fluorescens</i> sgpe	> 98.7
F8	<i>P. mendocina</i>	0.700	<i>P.putida</i>	> 98.7
BB6	<i>P. mendocina</i>	0.619	<i>P.putida</i> sgpe	> 98.7
BB10	<i>P. fluorescens</i>	0.400	/	/
GP4	<i>P.putida</i> biotype B	0.444	<i>Pseudomonas</i> sp	81
PI9	<i>Pseudomonas.sp</i>	0.475	<i>P.putida/P.monteilli</i>	99
F19	<i>P.mondocina</i>	0.677	<i>P.putida</i>	> 98.7
BB2	ND	/	<i>P.putida/P.monteilli</i>	99
BB9	ND	/	<i>P.putida/P.monteilli</i>	96
PI11	<i>P.mondocina</i>	0.514	<i>P.putida</i>	> 98.7

ND : Non donné



The type strains are indicated with T.

Figure II. 6 : Arbre phylogénétique (ARNr 16S) des espèces validées avec des similarités $\geq 97\%$.

II.4.DISCUSSION

Les résultats de l'identification phénotypique et génotypique (Tableau II.9), ont révélé une forte hétérogénéité du genre *Pseudomonas*. Globalement, les caractérisations phénotypiques utilisées n'ont pas permis de réaliser une identification totale et précise. Il a été noté des différences entre les trois méthodes d'identification utilisées. La détermination des profils trophiques des souches a mis en évidence une grande diversité dans leur métabolisme carboné ; néanmoins il n'y pas eu de concordance entre les résultats de l'identification et les profils trophiques, ce qui révèle les limites des tests phénotypiques d'identification des *Pseudomonas*. Ces résultats confirment la faiblesse de ces approches phénotypiques pour une caractérisation stable.

Bien que la classification multivars montre une forte hétérogénéité phénotypique, elle demeure cependant comme le système le plus utilisé dans la classification de ce groupe bactérien (Lemaceau *et al.*, 1995; Latour, 1996; Latour *et al.*, 1996). Initialement les *Pseudomonas* spp. fluorescents renfermeraient trois espèces (*P. fluorescens*, *P. putida* et *P. chlororaphis*) et *P. aureofaciens* rattachée par la suite à *P. chlororaphis* (Johnson et Palleroni, 1989). Les espèces *P. fluorescens* et *P. putida* ont été subdivisées sur la base des tests phénotypiques, respectivement, en 5 et en 2 biovars (Stanier *et al.*, 1996; Palleroni, 1984). Elles se caractérisent par une grande hétérogénéité phénotypique (Bossis *et al.*, 2000).

Palleroni *et al.*, (1993) ,ont montré par des études d'hybridation ADN-ARNr que le genre *Pseudomonas* renfermait des espèces très diversifiées dont les similarités sont parfois faibles, sur la base de ce critère moléculaire, le genre *Pseudomonas* a été subdivisé par Palleroni (1984) en 5 groupes d'homologie (I, II, III, IV,V) (Benchabane, 2005). Dans une étude phénotypique réalisée par Stanier *et al.*, (1996) sur une collection de souches saprophytes issues d'origines diverses, il a été mis en évidence une forte hétérogénéité chez les espèces *P. fluorescens* et *P. putida*. Les souches du biovar V sont très hétérogènes et montrent dans leurs caractéristiques une grande variabilité, rendant difficile leur différenciation des autres biovars (Palleroni,1984 ; Bossis *et al.*, 2000). Les études taxonomiques réalisées par divers auteurs (Stanier *et al.*, 1966 ; Bossis,1995 ; 2000 ; Palleroni, 2015) indiquent que la définition actuelle des espèces en biovars n'est pas assez précise, laissant des confusions sur les plans spécifique et infraspécifique.

Les études réalisées depuis plus d'un siècle sur ce genre bactérien ont mis en évidence une complexité dans ses caractéristiques taxonomiques. La majorité des études taxonomiques sur les *Pseudomonas* spp. fluorescents a révélé la complexité de la variabilité au niveau des différentes espèces appartenant à ce groupe (Palleroni et Stanier, 1964 ; Digat et Gardan, 1987; Bossis *et al.*, 2000 ; Palleroni, 2015). En effet, il est souvent difficile de réaliser une identification précise et de faire la distinction entre les différentes espèces (Benchabane, 2005; Garrido-Sanz *et al.*, 2016).

Outre leur signification taxonomique, les tests biochimiques utilisés pour l'identification des isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents, peuvent être considérés comme indicateurs de l'aspect des profils métaboliques de ces bactéries, qui semble être un avantage pour leur adaptation au sol et dans la rhizosphère (Benchabane, 2005). *Pseudomonas* est l'un des genres les plus complexes et les plus variés, comme en témoignent les nombreuses espèces décrites (plus de 100) (Palleroni, 2015). Depuis sa description initiale (Palleroni et Stanier, 1964), la taxonomie a subi de nombreux changements et remaniements. Plusieurs études ont évalué de manière informelle la présence de groupes et de sous-groupes au sein des genres (Gomila *et al.*, 2015 ; Mulet *et al.*, 2010), dont le groupe *Pseudomonas fluorescens*, où plus de 50 espèces nommées ont été décrites et divisées en sous-groupes qui diffèrent de l'analyse de séquence multiloci du (MLSA) et l'analyse phylogénomique (Gomila *et al.*, 2015, Redondo-Nieto *et al.*, 2013).

La quasi-totalité des études taxonomiques réalisées sur les *Pseudomonas* spp. fluorescents, particulièrement *P. fluorescens* et *P. putida*, a signalé la difficulté et la complexité dans l'élaboration de critères taxonomiques précis. Ces études ont révélé la complexité et la variabilité au niveau des différentes espèces appartenant à ce groupe (Palleroni *et al.*, 1972; Delorme, 2002; Benchabane, 2005 ; Peix, 2009 ; 2018). L'hétérogénéité que l'on rencontre chez certaines espèces et leurs biovars laisse la classification des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents sujette à beaucoup de divergences (Bossis *et al.*, 2000 ; Palleroni 2015 ; Garrido-Sanz *et al.*, 2016).

L'énorme hétérogénéité phénotypique et génétique démontrée par les souches appartenant au groupe *P. fluorescens* (Loper *et al.*, 2012) a conduit à une évaluation difficile de sa phylogénie qui n'englobe pas complètement la taxonomie, et la proposition selon laquelle un complexe d'espèces façonne la phylogénie du groupe

P. fluorescens (Seaton et Silby, 2014). Une autre difficulté de ce groupe est la description fréquente de nouvelles espèces, telles que *P. protegens* (Ramette, 2011), et de sous-espèces, telles que *P. brassicacearum* subsp. *néoaurantiaca* (Ivanova et al., 2009), et l'inclusion de souches dans le groupe *P. fluorescens* (*P. sp.*UW4) (Duan et al., 2013).

Les phylogénies basées sur la petite séquence de sous-unités ribosomales (séquence du gène de l'ADNr 16S) ont été l'une des méthodes les plus courantes pour les analyses phylogénétiques des bactéries (Peix et al., 2009). Cependant, cette méthode est problématique en raison de son manque de résolution lors de la comparaison d'organismes étroitement apparentés, ainsi que d'événements de recombinaison et de transfert de gène latéral (Ramette et al., 2011). L'analyse de séquence multilocus (MLSA) résout souvent les problèmes des phylogénies déduites de l'ADNr 16S (Gevers et al., 2005) et s'est révélée plus fiable que l'ADNrS 16S du genre *Pseudomonas* (Kämpfer et Glaeser, 2012), dans laquelle la séquence de trois gènes de ménage concaténés (*gyrB*, *rpoD*, *rpoB*), ainsi que l'ADNr 16S ont bien démontré qu'ils permettaient de déduire une phylogénie relativement meilleure (Mulet et al., 2010).

L'analyse des profils d'acides gras (FAMES) a également été proposée comme méthode d'identification (Mansfeld-Giese et al., 2002; Chao et al., 2010; Janisiewicz et Buyer, 2010), en particulier pour l'identification de souches phytopathogènes (Gitaitis et al., 2012; Gumtow et al., 2013; Bozkurt et al., 2016; Webb et al., 2016).

Les profils SDS-PAGE, polyamine et sidérophores ne sont actuellement pas inclus dans les marqueurs taxonomiques nécessaires pour les nouvelles descriptions (Auling et al., 1991; Vancanneyt et al., 1996; Meyer et al., 1996, 2002). Le sidérotypage a été utilisé pour caractériser de nouvelles espèces, telles que *P. costantinii* (Munsch et al., 2002), *P. salomonii* (Gardan et al., 2002), ou les non-pathogènes *P. palleroniana* (Gardan et al., 2002) et *P. protegens* (Ramette et al., 2011). Des techniques protéomiques sont sollicitées pour une meilleure clarification de la taxonomie de ces bactéries, qui peuvent être prometteuses.

Il faut souligner que toutes les nouvelles espèces sont phylogénétiquement très diverses. Une telle diversité n'est pas surprenante compte tenu des habitats très hétérogènes où ces espèces ont été trouvées, ce qui reflète que *Pseudomonas* est un genre omniprésent. Étant donné que la plupart des environnements n'ont toujours pas été étudiés du point de vue microbiologique, il faut s'attendre à ce que le nombre

de nouvelles espèces de *Pseudomonas* augmente considérablement dans les années à venir (Peix et al., 2018).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Ainsi leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (Haas et Keel, 2003 ; Garrido-Sanz et al., 2016). Cette grande rhizocompétence vient de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres bactéries; et de leur capacité à utiliser une gamme de substrats très large, souvent issus des exsudats racinaires, comme source d'azote ou de carbone. De plus, elles sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (Moore et al., 2006 ; Wu et al., 2011).

D'après les résultats obtenus, ou il a été constaté que les deux espèces de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* sont très répandus dans les sols cultivés de diverses plantes hôte, concordent avec ceux de Holloway (1992) ; Schroth et al (1992) qui notent que les deux espèces se rencontrent dans divers biotopes à des densités élevées.

L'analyse de la diversité taxonomique des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents en fonction de leur origine (biotope) montre, en grande partie, que leur distribution est aléatoire. D'une manière générale, les tests biochimiques utilisés, outre leur signification taxonomique, ils peuvent être des indicateurs sommaires de l'aspect métabolique de ces rhizobactéries, qui semblent essentiels pour leur adaptation au sol et à la rhizosphère.

Les travaux de Digat (1993) et Benizri et al (2001), basés sur la diversité des populations rhizosphériques suggèrent qu'il pourrait exister des mécanismes de « spécificité » ou « sélectivité » de l'effet rhizosphérique aboutissant à la stimulation préférentielle de certains phénotypes bactériens en fonction de la plante hôte.

Les *Pseudomonas* sont abondants dans le sol, particulièrement au voisinage du système racinaire des plantes dans différentes régions, et leur colonisation efficace des parties souterraines des plantes, signe de leur potentiel d'adaptation (Lugtomberg et al., 2001; Benchabane, 2005). Elles se caractérisent aussi par un meilleur développement dans la rhizosphère par rapport au sol nu (Latour et Lemanceau, 1997, Benchabane, 2005).

Au sein des populations rhizosphériques, les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont prédominants et peuvent constituer plus de 60% de la microflore bactérienne (Foster et Rovira, 1978 ; Digat et Gardan, 1987). Ces résultats confirment, selon ces auteurs, qu'il y a un «effet rhizosphérique sélectif» interactif entre les souches bactériennes et les plantes hôtes. La vitesse de division cellulaire de ces bactéries dépend de la richesse du milieu en composés organiques et de leur métabolisme. Les exsudats racinaires de certaines plantes peuvent influencer la composition et l'activité de la microflore racinaire (Rovira et Davey, 1971).

La distribution des isolats bactériens en fonction de leur origine a mis en évidence que la plante a une influence sélective sur les populations des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Ces dernières diffèrent d'un sol cultivé à l'autre, et d'une rhizosphère à l'autre, selon l'espèce végétale. L'association des *Pseudomonas* avec les végétaux et notamment avec les plantes cultivées constitue un aspect intéressant du point de vue écologique (Keel *et al.*, 1996). La versatilité nutritionnelle des *Pseudomonas* (Misko et Germida, 2002 ; Pacheco *et al.*, 2003), ainsi que le caractère ubiquiste et le pouvoir d'adaptation à des conditions écologiques variées a été mentionnée dans de nombreux travaux (Latour et Lemanceau, 1997; Bossis *et al.*, 2000). D'autres espèces, sont associées aux racines de plantes, c'est le cas de *P. brassicacearum* (ail) et *P. thivervalensis* (riz) (Achouak *et al.*, 2000). *P. rhizosphaerae*, *P. lutea* et *P. argentinensis* de la rhizosphère de gazons (Peix *et al.*, 2003, 2004, 2005), ou encore des phyllosphères des plantes comme *P. lurida* (Behrendt *et al.*, 2007).

La clarification de la taxonomie requiert des recherches complémentaires qui associent des méthodes récentes phénotypiques et génotypiques plus poussées. Il a été suggéré d'élaborer une identification basée sur une taxonomie polyphasique pour différencier les espèces, permettant à la fois de réaliser une caractérisation phénotypique et une caractérisation génotypique. L'environnement et les facteurs trophiques jouent un rôle majeur dans leur évolution, certains de ces facteurs sont probablement impliqués dans le processus de spéciation de ces bactéries ubiquistes.

Chapitre III: Métabolites secondaires

Chapitre III : Métabolites secondaires

III.1. Introduction

Dans le sol, les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne tellurique, on les retrouve partout, particulièrement au voisinage des systèmes racinaires des plantes. Leur capacité à coloniser les racines et d'y maintenir une forte densité de populations est remarquable (Haas et Keel, 2003 ; Benchabane et al., 2013). Cette rhizocompétence est favorisée par leur croissance élevée, relativement concurrentielle en temps de générations par rapport à la plupart des autres rhizobactéries, en plus de leur capacité à métaboliser divers et plusieurs composés formant les exsudats racinaires (Chin-A-Woeng et al., 2003 ; Blom et al., 2011). Une telle adaptation à l'environnement rhizosphérique a rendu certaines espèces de *Pseudomonas* interactives avec les plantes, en y assurant des effets phytobénifiques, directement pour la plante en améliorant sa balance nutritionnelle, ou indirectement en inhibant ou en éliminant les activités délétères et phytopathogènes des agents biotiques indésirables (Fenton et al., 1992; Chin-A-Woeng et al., 2001; Hinsinger, 2010 ; Malek, 2015). Ce genre d'activités, profitable pour les plantes, est assuré grâce à l'arsenal de métabolites secondaires synthétisé par ces rhizobactéries adaptées aux niches rhizosphériques.

Depuis plusieurs années de nombreux travaux ont démontré, chez le groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents, l'implication d'une partie de ces métabolites dans le biocontrôle des agents phytopathogènes et dans la phytostimulation de la croissance des plantes (Defago et Haas, 1990; Lemanceau, 1992; Ton et al., 1999; Van Loon et Glick, 2004; Gao et al., 2012; Mavrodi et al., 2012; Sharifi-Noori et al., 2015; Hussein et Joo, 2017; Mishra et al., 2018). La complexité de cette interaction rhizobactérienne avec les plantes, qui est surtout non symbiotique, ajoutée à la grande diversité des métabolites impliqués ont ouvert les voies sur une recherche pluridisciplinaire touchant, entre autres, les aspects microbiologique, biochimique, génétique et écologique (Kim et al., 2004; Mavrodi et al., 2006 ; Charde et al., 2010; García-Gutiérrez et al., 2012 ; Chincholkar et Thomashow, 2014 ; Naureen et al., 2015; Mishra et Arora, 2017).

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à mettre en évidence la synthèse de quelques métabolites secondaires, chez des souches de ce groupe de

rhizobactéries, connus par leur implication dans les effets phytobénéfiques recherchés en biocontrôle et/ou en phytostimulation.

III.2. Matériel et Méthodes

III.2.1. Matériel biologique

A l'issue du travail réalisé initialement (cf. chapitre I), accompli sur l'isolement et la caractérisation des souches rhizobactériennes isolées des différents biotopes, dix-sept (17) souches de *Pseudomonas* fluorescents, sélectionnées sur la base de leurs profils trophiques et moléculaire, ont été analysées quant à leur aptitude à produire certains métabolites secondaires. A titre de souches de référence et de comparaison, deux souches types de *Pseudomonas fluorescens*, ont été utilisées dans nos travaux d'antagonisme et de caractérisation métabolique :

- Une souche de référence B545 et la phénazine-1-carboxylate [PCA], utilisée comme standard, nous ont été offerte aimablement par le Pr Philippe Thonnard, (Gembloux, Belgique).
- La souche CHA0, très connue par ses activités phytobénéfiques et la diversité de ses métabolites secondaires (Pr. Kristopher Keel, Laboratoire de Biologie microbienne, Université de Lausanne, Suisse).

III.2.2. Production de siderophores

La détection des sidérophores a été réalisé dans le milieu CAS (Chrome Azurol S) en boîte de Pétri, selon les techniques d'Alexander et Zuberer (1991). Des cultures bactériennes de 24h sur milieu King B (King et *al.*, 1954) ont été déposées en spots sur la surface du milieu CAS et incubées 72h à 28 °C. L'apparition d'un halo orangeâtre sur le fond bleuté du milieu indique une synthèse de sidérophores (Schwyn et Neilands, 1987; Sharma et Johri ,2003).

III.2.3. Production de l'acide indole acétique (AIA)

La production d'IAA a été déterminée selon la méthode standard de Bric *et al.*, (1991). Une colonie isolée est étalée sur gélose Luria-Bertani enrichi du tryptophane. La gélose a été recouverte de papier Whatman n° 1, puis incubée à 28°C/48h. Le papier est récupéré et traité avec le réactif de Salkowski (2% de FeCl₃ à 0.5M dans 35% d'acide perchlorique). Après 10 à 30 min, la production d'IAA et/ou de ses analogues se manifeste par la formation d'un halo rose à rouge autour des colonies. Pour les souches productrices d'autres types d'indoles, la coloration est jaune à jaune brune (Naik et Sakthivel, 2006).

La quantification de production de l'AIA a été réalisé sur le milieu de Winogradsky (Holt *et al.*, 1994) additionné de tryptophane (5g/l). Le milieu est ensemencé par 100 µl de suspensions bactériennes et incubé 96 h à 30 °C. Selon la méthode de Loper et scroth (1986), les cultures ont été centrifugées (5000 rpm, 20min) et un millilitre (1ml) du surnageant a été additionné de 2ml du réactif de Salkowski (50ml d'acide perchlorique 35% et 1 ml de FeCl₃ à 0,5M) et de quelque gouttes d'acide orthophosphorique. Les densités optiques ont été mesurées à 530nm après 30 mn d'incubation. Les concentrations de l'AIA sont déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue dans un intervalle de 0 à 10⁻³ M d'AIA (Fluka) (Annexe III).

III.2.4. Phosphatases

La solubilisation des phosphates a été évaluée qualitativement, en déposant des aliquotes de 100µl (10⁷ UFC/ml) de cultures bactériennes fraîches (24 h) sur le milieu de Pikovskaya (Mehta et Nautiyal, 2001). Cette méthode est basée sur la décoloration du Bleu-Bromo-Phenol (BPB) suite l'abaissement du pH du milieu par production de phosphatases. Après incubation (96h à 28°C), la décoloration du milieu autour des colonies est un indicateur d'une solubilisation des phosphates.

III.2.5. Pectinases

La production de pectinases a été déterminée selon la méthode décrite par Cattelan *et al.*, (1999) sur le milieu gélosé M9 (Miller, 1974), supplémentée de 4,8g/l de pectine et de 1.2g d'extrait de levures. Après incubation (48h à 28°C) et application de quelques gouttes d'HCl (73 g/l), l'apparition d'un halo claire autour des colonies indique une réaction positive.

III.2.6. Lipases

La recherche de lipases a été effectuée par la mise en culture des isolats sur le milieu TSA (Tryptone Soya Agar) additionné de 1% d'acide oléique. Une réaction positive est marquée par l'apparition d'un halo clair autour des colonies après 5 à 7 jours d'incubation à 28°C (Degroot *et al.*, 1991).

III.2.7. Protéases

L'activité protéolytique a été déterminée selon la méthode de Smibert et Krieg (1994), par la mise en culture pendant deux jours d'incubation à 28°C des isolats sur gélose au lait écrémé .Le développement d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive (Naik et Sakthivel, 2006).

III.2.8. Chitinases

L'activité chitinolytique a été testée selon la méthode décrite par Reniwick *et al.*, (1991) sur gélose à la chitine. La formation d'halos clairs autour des colonies après 5 jours d'incubation à 30°C indique une chitinase positive (Naik et Sakthivel, 2006).

III.2.9. Cellulases

La production de cellulases a été déterminée selon la méthode de Cattelan *et al.*, (1999) sur la gélose M9 (Miller, 1974) supplémentée de 10 g de cellulose et de 1.2 g d'extrait de levures. Les isolats ont été étalés puis incubés (8 jours à 28°C) ; le développement d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive (Verma *et al.*, 2007).

III.2.10. Amylases

Des cultures fraîches (24 h) sont déposées sur gélose nutritive additionnée d'amidon par ensemencement par trait au centre de la boîte de Pétri. Après incubation à 30°C pendant 48h, une solution de lugol préalablement préparée sera dispersée sur toute la surface du milieu. La présence de l'amidon dans le milieu donnera une couleur bleue noirâtre, signifiant l'absence d'activité amylasique. La présence d'une activité amylolytique est indiquée par la formation d'une zone claire (halo) autour de la crème bactérienne (Vinoth Raj *et al.*, 2009).

III.2.11. Production de NH₃

Le test qualitatif, de production d'ammoniaque, a été réalisé selon la méthode de Capuccino et Sherman (1992). Il consiste à inoculer 100 µl de la suspension bactérienne dans 10 ml d'eau peptonée (EP) (Cheminova). Après incubation (30 °C, 96h), 500 µl du réactif de Nessler (Prolabo) ont été ajoutés, le développement d'une couleur jaune ou orange indique la production de NH₃ par les souches testées.

III.2.12. Production de cyanure d'hydrogène (HCN)

La production de cyanure d'hydrogène (HCN) a été recherchée par la technique de Bakker et Schippers (1987). Le milieu TSA (Tryptone Soya Agar) supplémenté avec 4,4 g/l de glycine a été ensemencé à partir d'une culture de *Pseudomonas* spp fluorescents âgée de 24h. Un papier Whatman n°1 (Ø= 8cm) imprégné d'une solution de couleur jaune (5% d'acide picrique et 2% de carbonate de sodium) a été déposé aseptiquement sur la face interne du couvercle de la boîte de Pétri et scellée ensuite par le para film. Après incubation à 28 °C pendant 4 jours, la production d'HCN se traduit par le virage du papier du jaune à l'orange. Le cyanure d'hydrogène réagit en

effet sur l'acide picrique pour donner une matière colorante (l'acide isopurpurique) qui exprime le virage de la couleur.

III.2.13. Production de Phénazines (PHZ)

III.2.13.1. Sélection de souches antagonistes *in vitro*

Avant d'entamer la procédure de rechercher des souches, éventuellement productrices de phénazines, nous avons ciblé les souches présentant une large activité antagoniste (antimicrobienne) *in vitro* vis-à-vis d'une collection d'agents phytopathogènes (laboratoire de Phytopathologie, Département des Biotechnologies, Université de Blida1).

Les 17 souches ont été testées pour leurs activités antibactériennes vis-à-vis de quatre isolats bactériens : *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganens*, *Agrobacterium tumefaciens* et *Erwinia carotovora*. Les activités antifongiques ont été testées en confrontation avec neuf isolats : *Rhodotorula mucilaginosa*, *Geotriticum sp*, *Gaeumannomyces graminis var tritici*, *Pythium ultimum*, *Eutypia lata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum f sp lini*, *Coleosporium sp* et *Fomitiporia sp*. Les essais ont été répétés trois fois pour chaque interaction.

Les tests antifongiques ont été réalisés selon la méthode décrite par Vincent et al., (1991). Les souches de *Pseudomonas*, âgées de 24 h, sont étalées en lignes, distantes des 1,5 cm des deux bords de la boîte de Pétri contenant le milieu KB (Annexe I). Un disque fongique ($\phi = 6$ mm), prélevé d'une culture âgée de 7 jours, est déposé au centre de la boîte et laissée en incubation à 28 °C. Les résultats sont notés lorsque la croissance mycélienne, dans les boîtes témoins (champignons seuls, sans la présence des isolats de *Pseudomonas*), atteint les points d'inoculation des souches bactériennes, permettant de mesurer les zones d'inhibition (Hariprasad et al., 2009).

Pour les interactions avec les bactéries phytopathogènes, des disques de papier wathman (n°3) imprégnés de la crème de souches de *Pseudomonas*, âgée de 24 h, ont été déposés à la surface du milieu de culture, préalablementensemencé par les souches phytopathogènes. Après incubation à 25 °C, lorsque les témoins (bactéries phytopathogènes sans la présence des isolats de *Pseudomonas*) sont à leur maximum de croissance ; s'il y a développement d'antagonisme, la notation des zones d'inhibition est mesurée.

III.2.13.2. Synthèse de phénazines *in vitro*

Seules les souches de *Pseudomonas*, parmi les 17 testés précédemment (cf. III.2.13.1), ayant montrées des activités antimicrobiennes, ont subi le test de production *in vitro* de phénazines ou de leurs analogues. Ce test a été réalisé selon la méthode de Thomashow et Weller (1988), dans le milieu NBY (Nutrient Broth Yeast extract) additionné de glucose (2%), ensemencé avec une culture de 24h et incubé pendant 48h à 25°C. Après examen des cultures sous UV (356 nm), le développement de colonies bactériennes pigmentées, avec des halos sombres noirâtres, est révélateur d'une activité phénazinique.

III.2.13.3. Activité antibiotique

Le pouvoir antagoniste des souches, révélées positives en production de phénazines, a été étudié *in vitro* de manière plus détaillée par la technique des stries croisées (Waksman, 1945 ; Williston et *al.*, 1947). Celle-ci est une technique simple et pratique, largement utilisée pour le criblage de souches microbiennes présentant des activités antibiotiques. Les tests ont été réalisés sur quatre milieux de culture :

- Le milieu King B ou « KB » (King et *al.*, 1954).
- Le milieu gélose nutritive ou « GN » (Gardan et Luisetti, 1981).
- Le milieu Potato Dextrose Agar ou « PDA » (Jonhston et Booth, 1982).
- Le milieu ISP2 « International *Streptomyces* Project » (Shrirling et Gottlieb, 1966).

Sur chaque milieu, en trois répétitions, les souches de *Pseudomonas* ont été ensemencées en un seul trait à la surface des milieux solides et en bordure de la boîte de Pétri et incubées à 28 °C. Après 24 h, les microorganismes à tester (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Fusarium oxysporum* f.sp *albedenis*) ont été ensemencés en traits perpendiculaires, au trait de la culture précédemment réalisé, et incubés à la même température pendant 2 à 5 jours. A titre de témoins, les souches tests ont été cultivées, selon la même procédure, sans la présence de souches de *Pseudomonas* pour évaluer leur croissance optimale. Ainsi, nous mesurons les zones d'inhibition pour les souches antagonistes, suspectées de synthèse de phénazines.

III.2.13.4. Extraction des composés (phénaziniques)

Les souches ayant montrées une activité antimicrobienne sont sélectionnées, pour en extraire, éventuellement, les composés à effet antibiotique selon le protocole suivant (Figure III.1).

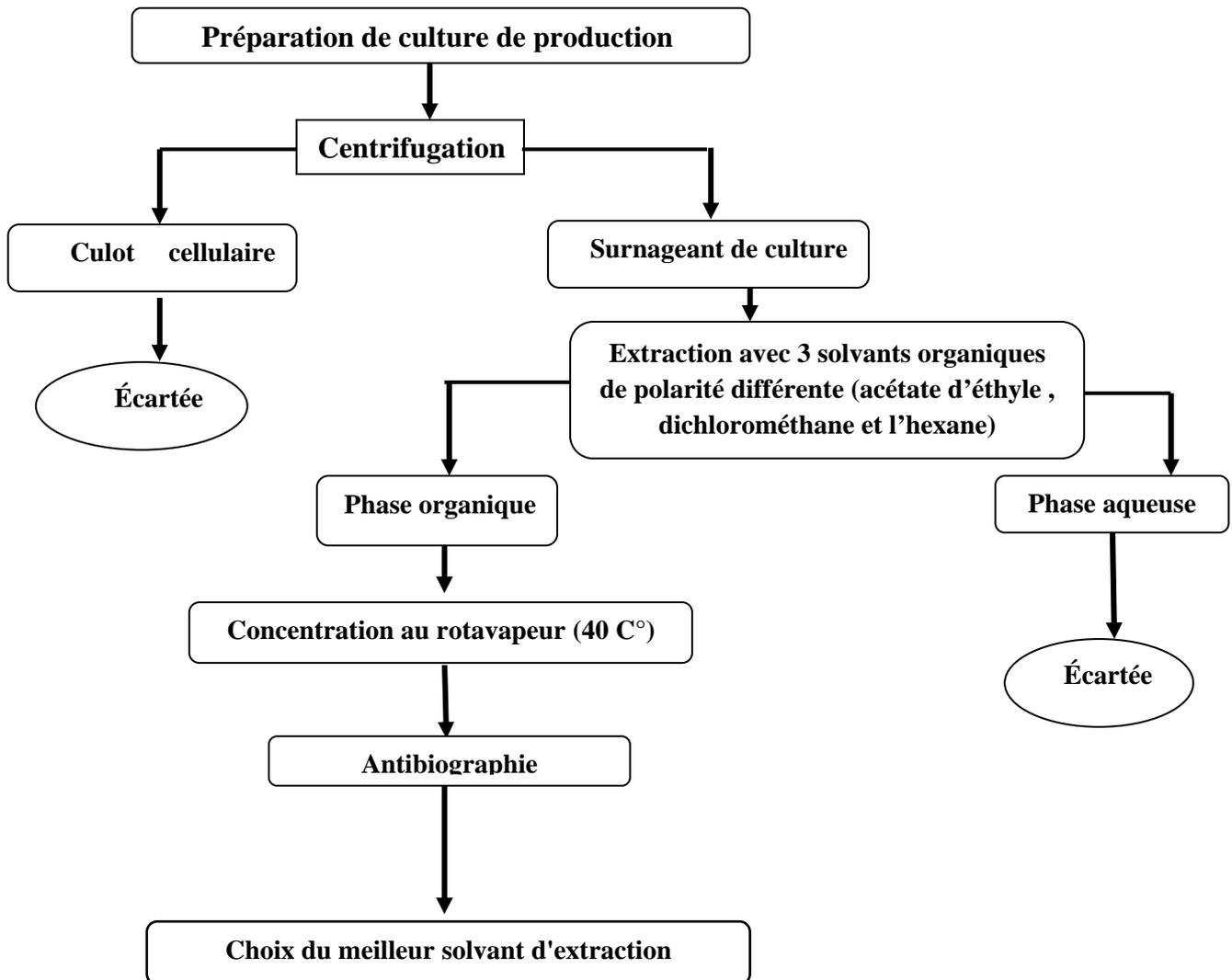


Figure III.1 : Protocole de production et d'extraction des phénazines

Pour la préparation des cultures bactériennes, chaque souche a été cultivée dans 100 ml de milieu King B à l'état liquide ensemencés avec 3 ml d'une préculture de 24 h. Après incubation de 48 h à 25 °C, sous agitation continue (150 rpm), les suspensions bactériennes sont centrifugées (5000 tour, 15 min à la température ambiante) pour séparer les culots des surnageants.

Des tests préliminaires ont été effectués pour optimiser l'extraction des composés antibiotiques à partir du surnageant de culture. A cet effet, trois solvants

de différentes polarités ont été testés : acétate d'éthyle, dichlorométhane et l'hexane. L'extraction a été effectuée dans une ampoule à décanter avec un mélange (1/2 solvant(s), 1/2 surnageant) de culture, puis agité doucement quelques secondes avec dégazage de temps à autre. Après agitation et décantation, les phases organiques ont été récupérées séparément, filtrées sur sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer toute trace d'eau, puis évaporées sous vide à 40 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif (Buchi heating bath B-490). Les extraits secs obtenus ont été récupérés dans 1 ml de méthanol avant d'être soumis à une antibiographie, afin de déterminer le meilleur solvant d'extraction.

III.2.13.5. Tests Antibiographie

Les extraits obtenus, à partir de surnageants des cultures des souches productrices de phénazines, plus la souche de référence (CHA0), ont été testés contre les microorganismes tests : *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Fusarium oxysporum* et *Staphylococcus aureus*.

Des disques ($\phi = 6$ mm) de papier wathman ont été imprégnés avec 30 μ l d'extrait organique, puis séchés à l'aide d'un séchoir à froid. Les disques ont été ensuite stérilisés sous UV (254 nm) durant 30 min avant d'être déposés aseptiquement à la surface du milieu Muller Hinton, préalablement ensemencé par les microorganismes tests. Les boîtes sont d'abord déposées à 4°C pendant 2 h, pour une meilleure diffusion des éventuels composés antibiotiques et ensuite incubées 24 h à 28 °C.

La lecture des résultats consiste à déterminer le diamètre des zones d'inhibition autour des disques. Le solvant permettant d'obtenir le diamètre d'inhibition le plus élevé est considéré comme le meilleur solvant d'extraction.

III.2.13.6. Analyse des composés (phénaziniques)

Il est déjà reconnu que chez les *Pseudomonas* synthétisent une mixture de composés phénaziniques (Tomashow et al., 1990), donc Il semble impératif d'essayer de fractionner l'extrait brut avant l'étape d'identification. La purification des substances actives des souches de *Pseudomonas* a été réalisée par chromatographie en couches minces (CCM), alors que l'identification s'effectue par chromatographie en phase liquide à haute pression (HPLC).

A. Chromatographie en couche mince : Selon les descriptions de Betina (1973), la séparation des composés à activité antibiotique, à partir des extraits de surnageant de chaque souche de *Pseudomonas* testée, a été réalisée par chromatographie en couche mince sur gel de silice (silcagel : 20×20 cm, 0,25 mm d'épaisseur). Les extraits des souches productrices de phénazines et le témoin (standard) étant l'acide phénazine-1-carboxylique (PCA), ont été déposés sous forme de spots (150 µl) à l'aide d'un capillaire à des points repères au bord inférieur de la plaque, suivi de séchage à l'aide d'un séchoir. Deux associations de solvants ont été appliquées : le solvant AM (acétate d'éthyle-méthanol : 100/15) et le solvant CA (chloroforme-acétone : 9/1). Les plaques ont été placées dans des cuves en position verticale. La révélation chimique a été réalisée avec le formaldéhyde-H₂SO₄ (révélateur de composés aromatiques polycycliques). Après pulvérisation des plaques avec le révélateur, les résultats ont été lus à chaud (5 min à 100°C) et le rapport frontal (Rf) a été calculé. Le Rf est le rapport de la distance entre le dépôt et la tache active sur la distance séparant le dépôt du front du solvant.

B. Chromatographie liquide haute performance (HPLC) : Les spots, obtenus précédemment, ont été grattés et élués dans du méthanol sous agitation (100 rpm, 2 h à la température ambiante). Après filtration du mélange (silice + méthanol), le filtrat limpide a été évaporé à sec et conservé au congélateur pour analyse ultérieure par HPLC. Les extraits semi-purifiés ont été analysés par HPLC. Les essais ont été réalisés en phase inverse ; la phase stationnaire de la colonne C18 est une silice greffée avec des groupements organiques apolaires et la phase mobile est polaire. Il a été utilisé le mélange d'eau distillée et de méthanol (80-20%), avec un gradient continu. Le débit du solvant est fixé à 1 ml/min et la longueur d'onde de détection est de 220 nm. Avant l'injection des échantillons, la phase stationnaire (colonne) est conditionnée et équilibrée (conditions initiales) pendant 10 min. Lorsque la colonne est stabilisée, 20 µl de l'extrait ultra filtré (filtre de 0,45 µl) est injecté à l'aide d'une seringue de 1 ml. Les résultats obtenus sont donnés sous forme de chromatogramme.

III.3 Résultats

III.3.1. Métabolites secondaires

A partir des tests de production de métabolites secondaires, nous avons constaté que les 17 souches bactériennes de *Pseudomonas* fluorescentes synthétisent des siderophores, produisent l'ammoniaque et les chitinases et qu'elles ne produisent pas d'enzymes hydrolytiques (pectinases, cellulases et lipases) (Tableau III.1).

Tableau III.1 : Tests de production de métabolites secondaires

Sid	HCN	Phen	AIA	Amm	Phos	Prot	Chit	Cellu	Pect	Lip	Amy
17	16	3	6	17	16	10	17	0	0	0	13

Sid : Siderophore; HCN : Acide cyanidrique; Phen : Phenazne ; AIA : Acide indole acétique ; Ammo : Ammoniac ; Phos : Phosphatase Prot : Protease; Chit : Chitinase ; Cellu : Cellulase ; Pect : Pectinase; Lip: lipase ; Amy : Amylase .

Seule une souche est cyanogénèse négative, et 16 souches sont phosphatases positives. Une dizaine de souches sont aptes à synthétiser des enzymes protéolytiques et 13 souches sont amylase positive. La production de l'acide indole-3-acétique (AIA) a été révélée chez six souches seulement, alors que l'activité phénazinique n'est positive qu'avec trois souches parmi les 17 testées (Tableau III.1).

III.3.1.1. Synthèse de siderophores

Les 17 souches, déjà sélectionnées sur la base de la synthèse d'un pigment fluorescent diffusible sur le milieu KB, ont montré un halo orangeâtre net sur le milieu O-CAS indiquant la production de siderophores.

III.3.1.2. Cyanogénèse

Pendant les premières 24 heures, un léger virage du papier filtre imprégné d'acide picrique a été observé chez la plupart des souches, pour devenir plus apparent après 36 h et net entre 48 h et 72 h, traduisant une intensification de la production d'HCN. La production était faible chez avec six souches et forte avec dix souches. Ces dernières semblent les plus performantes en production de l'HCN, en virant la couleur du papier vers l'orangée foncée (Tableau III.2).

Tableau III.2 : Production de cyanide d'hydrogène

Les souches de Pseudomonas testées	Production d'HCN
BB6, BB10, BT3, BT7, BS4, F8, F19, F23, PI9, PI11	++
BB9, F20, F21, F27, F48, GP4	+
BB2	-
B445, B447, CHAO*	++

* : Souches de référence, ++ : Fortement productrice ; + : Faiblement productrice ; - : Aucune production

III.3.1.3. Production de l'acide indole acétique (AIA)

La production qualitative de l'acide indole acétique et/ou ses analogues a été observée chez la plu part des isolats testés. Toutefois six (6) de ces derniers (BB2, BB10, F8, F21, F48, GP4) ont développés une coloration rose à rouge après 10 à 30 min d'addition du réactif révélateur. Pour les souches productrices d'autres types d'indoles, la coloration est jaune à jaune brune dont l'intensité varie d'un isolat à un autre. La quantité de l'AIA est déterminée, d'après la courbe d'étalonnage (Annexe III) ; le taux le plus important a été enregistré chez la souche F48 (18,3 µg /ml) (Tableau III.3).

Tableau III.3: Production qualitative et quantitative d'Acide Indole Acétique (AIA)

Souches	Production	
	Qualitative	Quantitative µg/ml
F8	++	3,8
F19	(+)*	Nd
F20	(+)*	Nd
F21	+	1,8
F23	(+)*	Nd
F27	(+)	Nd
F48	+++	18,3
BB2	+++	7,6
BB6	(+)*	Nd
BB9	(+)*	Nd
BB10	+++	5,9
Bs4	(+)*	Nd
Gp4	+	1,7
PI9	(+)	Nd
PI11	(+)*	Nd
BT3	(+)	Nd
BT7	-	Nd

(-) : absence de coloration rose, (+) : légèrement rose, (++) : rose, (+++) : rose virant vers le rouge, Nd : non détectable (+)* : Analogue d'AIA

III.3.1.4. Production d'enzymes

Les tests enzymatiques qualitatifs ont permis de démontrer la production ou non des enzymes extracellulaires (phosphatases, pectinases, lipases) et les enzymes dégradants les parois cellulaires.

Phosphatases: Le test de solubilisation du phosphate indique que 94,11% des souches testées synthétisent la phosphatase qui solubilise le phosphore inorganique sous forme bicalcique. La décoloration du milieu de culture et/ou le développement d'un halo clair autour des spots, n'est devenu net qu'après 96h d'incubation. L'intensité de la couleur du milieu de culture et le diamètre des halos sont variable selon les souches, dénotant une variabilité dans le pouvoir de solubilisation du phosphore selon les isolats testés.

Pectinases: La production de pectinases a été révélée par l'inondation par quelques gouttes de HCL des cultures bactériennes ensemencées sur le milieu M9 additionné de 4,8 g/l de pectine et incubées pendant 2 jours. Les résultats montrent qu'aucune réaction positive n'est observée marquée par l'absence de formation d'halos autour des spots.

Lipases: Une réaction négative pour l'ensemble des souches testées est marquée lors de la mise en évidence de la production de lipases, dans le milieu TSA additionné de 1% d'acide oléique, après 7 jours d'incubation à 28 °C.

Enzymes dégradant les parois cellulaires (CWDE) : Relativement aux enzymes citées précédemment, l'activité protéolytique était plus importante et positive avec 12 souches bactériennes en dégradant les protéines par production de protéases. Le meilleur résultat était noté chez la souche BS4 (3 cm). L'activité chitinolytique est retrouvée positive chez la totalité des souches étudiées, qui sont cellulase négative.

III.3.1.5. Production d'ammoniaque

La production de l'ammoniaque est révélée chez toutes les bactéries. Le résultat positif se traduit par le virage de la couleur du milieu vers le jaune ou orange. La souche BB6 montre une production d'ammoniaque très importante (orange ++).

III.3.1.6. Production de composés phénaziniques

III.3.1.6.1. Sélection des souches antagonistes *in vitro*

. Les résultats des tests de détection de l'activité antagoniste *in vitro*, réalisé par les 17 souches de *Pseudomonas* fluorescents vis-à-vis de neuf isolats fongiques et 4 isolats bactériens, ont montré des activités antagonistes avec des taux variables. La totalité souches (100 %) ont montré des activités antagonistes au moins à l'encontre d'un agent phytopathogène fongique et bactérien. toute les souches ont provoqué l'inhibition de la croissance de plus de 50% des isolats fongiques et bactériens, parmi eux neuf souches ont montré l'inhibition de la croissance de la totalité des isolats phytopathogènes testées. Les 8 autres souches actives ont montré des activités seulement antifongiques.

Le degré d'antagonisme varie selon que les interactions soient avec les bactéries ou les champignons. D'après nos résultats, les souches de *Pseudomonas* ont noté des taux d'inhibition plus élevé vis-à-vis des isolats fongiques par rapport aux bactéries phytopathogènes. L'effet inhibiteur le plus élevé est noté par la souche BB9 vis-à-vis de toutes les espèces cryptogamiques et la souche F21 vis-à-vis de des bactéries phytopathogènes comparativement avec la souche de référence CHAO (Tableau III.4).

Tableau III.4 : Activités antagonistes *in vitro*

	Isolats fongiques phytopathogènes								
	E32	B112	Coll	GEO	F4	GGT	F8	Pyt	Rhod
Souches									
BT3	4	4	4	4	2	3	4	3	3
BB10	4	4	4	2	2	3	4	2	2
F48	4	4	4	4	4	4	4	1	2
PI9	4	4	4	3	4	4	4	4	2
BB9	4	4	4	4	4	4	4	4	4
F21	4	3	4	3	4	2	4	2	4
BB6	3	4	4	4	4	4	1	3	4
BS4	3	3	4	3	2	4	3	3	3
F20	2	4	4	3	3	2	2	3	2
CHAO*	3	3	4	3	2	3	4	4	2

GGT : *Gaymanomyces graminis var tritici* , **Coll** : *Colleosporium sp*, **Rhod**: *Rhodotorula mucilaginosa*
GEO: *Geotriticum sp*, **Pyt**: *Pythium ultimum*, **F4**: *Fusarium oxysporum f sp lini* , **F8** : *Fomitiporia sp*,
E32 : *Eutypia lata*, **B112** : *Botrytis cinerea* . * : souche de référence (*Pseudomonas fluorescens* CHA0).

0 ⇒ (X = 0, Absence d'inhibition), **1** ⇒ X ≤ 2 mm , **2** ⇒ 2 mm < X ≤ 10 mm, **3** ⇒ 10 mm < X ≤ 15 mm, **4** ⇒ X > 15 mm (X = zone d'inhibition) ; **Gras** : souches phénazines (+) *in vitro*.

III.3.1.6.2. Synthèse des phénazines *in vitro*

Les essais de la production des phénazines *in vitro* ont montré que parmi 17 souches antagonistes, trois souches (BB9, PI9, F21) ont révélé des zones sombres autour des colonies indiquant la synthèse des composés phénaziniques. Nous rappelons que ces derniers ont manifesté un pouvoir antagoniste important vis-à-vis des souches pathogènes fongiques et bactériennes avec un taux allant de 62% enregistré par la souche F21 vis-à-vis de l'isolat *Colleosporium sp* ,66% par BB9 vis-à-vis l'isolat *Geotriticum sp* et 70% par la souche PI9 vis-à-vis de l'isolat *Botrytis cinerea* (Annexe III). D'après les résultats obtenus les souches PI9, BB9, F21 sont les souches suspectées productrice des composés phénaziniques, en plus de deux souches de référence CHAO et B454.

Tableau III.5 : Activités antagonistes *in vitro*

Isolats bactériens phytopathogènes				
souches	<i>Rhalsonia solanacerum</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Clavibacter michiganens</i>
BT3	2	3	3	2
BB10	2	3	2	2
F48	2	3	3	2
F21	3	3	3	2
PI9	3	3	2	3
BB9	3	3	2	2
F20	2	3	2	3
BB6	2	3	3	3
BS4	3	2	3	3
CHAO*	2	2	3	2

(X = zone d'inhibition) : (X = 0, Absence d'inhibition), **1** : X ≤ 2 mm , **2** : 2 mm < X ≤ 10 mm, **3** : 10 mm < X ≤ 15 mm, **4** : X > 15 mm.

Gras : souches phénazines (+) *in vitro* * : souche de référence (*Pseudomonas fluorescens* CHA0).

III.3.1.6.3. Activités antibiotiques

D'après les résultats des différentes souches de *Pseudomonas* sur chaque milieu de culture, l'activité antimicrobienne des souches PI9, BB9, F21 se manifestent sur la majorité des germes testés. Cependant, leur intensité varie selon les microorganismes cibles et selon les milieux de culture (Tableau III.6).

Sur le milieu GN, de fortes inhibitions par les souches PI9, F21 vis-à-vis de *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* ont été notées, avec des zones d'inhibition moyennes, respectivement, de 16 mm et de 8 mm contre *Escherichia coli* et *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedenis*.

Sur le milieu King B, le diamètre de la zone d'inhibition le plus élevé (27 mm) est enregistré avec la souche CHAO vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedenis*. La souche PI9 vient en deuxième position (26 mm), alors que le plus faible diamètre (2 mm) a été noté avec les souches BB9 et CHAO vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. Dans ce milieu, les activités inhibitrices sont meilleures à l'encontre de FOA, BS et EC et un degré moindre contre SA.

Concernant le milieu ISP2, l'activité antimicrobienne apparaît faible vis-à-vis des différents pathogènes testés, avec des zones d'inhibition de l'ordre de 1 à 12 mm. Cette dernière a été enregistrée par CHAO vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedenis*.

Tableau III.6: Activités antagonistes exprimées en zones d'inhibition (mm).

Souches	Gélose nutritive GN				Milieu King B KB				International <i>Streptomyces</i> Project ISP2				Potato Dextrose Agar PDA			
	FOA	BS	EC	SA	FOA	BS	EC	SA	FOA	BS	EC	SA	FOA	BS	EC	SA
PI9	24	16	5	8	26	15	6	6	5	10	5	4	7*	5	4	8*
F21	20	15	13	4	16	14	14	5	1	5	15*	4	0	4	3	5*
BB9	16	10	9	1	18	12	8	2	3	4	5	8*	0	5	4	0
B454	18	15	5	3	24	10	9	4	2	10	4	1	3	5	8	0
CHAO	22	13	5	5	27	14	5	2	12	9	4	1	1	6	6	1

*: Le microorganisme subit seulement un ralentissement de la croissance, **BS**: *Bacillus subtilis*, **EC**: *Escherichia coli*, **FOA**: *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedenis*, **SA**: *Staphylococcus aureus*.

En comparant les résultats de diamètre des zones d'inhibition par rapport aux milieux utilisés (GN, KB, ISP2 et PDA), nous remarquons que les diamètres sont plus élevés sur le milieu KB.

III.3.1.6.4. Extraction des composés à effet antibiotique

L'extraction des composés à effet antibiotique a été effectuée à partir des souches PI9, BB9, F21 dans le milieu de culture King B qui a donné de meilleurs résultats de point de vue activité biologique. Les extraits obtenus ont été testés par antibiographie, afin de déterminer le meilleur solvant d'extraction.

III.3.1.6.4.1. Antibiographie

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le meilleur solvant d'extraction. Cette étude est basée sur la mesure de diamètre des halos d'inhibition de l'extrait obtenu (Annexe III). L'extrait à l'acétate d'éthyle s'est montré efficace contre *Bacillus subtilis* et Foa pour les souches PI9, BB9, F21 et la CHAO. La zone d'inhibition enregistrée s'étend de 14 mm à 19 mm contre *Bacillus subtilis* et de 18 mm à 28 mm contre Foa. Pour le dichlorométhane les zones d'inhibitions s'étendent de 11 mm à 17 mm contre *Bacillus* et de 8 mm à 10 mm contre *E. coli* et de 12 à 18 mm contre Foa.

Pour l'hexane les zones d'inhibition s'étendent de 6 à 8 mm. La zone d'inhibition enregistrée contre *Staphylococcus aureus* s'étend de 6 mm à 9 mm pour toutes les souches de *Pseudomonas* et dans tous les solvants utilisés.

Le métabolite extrait au moyen de l'acétate d'éthyle a empêché la croissance de la plupart des agents pathogènes testés. Le deuxième solvant était le dichlorométhane suivi par l'hexane. Selon nos résultats, le meilleur solvant d'extraction est l'acétate d'éthyle. Les disques témoins, imbibés par les solvants utilisés lors de l'extraction et séchés dans les mêmes conditions, n'ont révélé aucune activité antimicrobienne.

III.3.1.6.4.2. Chromatographie en couche mince (CCM)

La chromatographie en couche mince a été établie dont le but de la purification. Les extraits obtenus par le meilleur solvant d'extraction provenant du surnageant de la culture de milieu King B ont été déposés au bord inférieur de la plaque, après migration du solvant (Figure.III.2).

Dans la phase mobile acétate d'éthyle-méthanol (AM), six taches ont été détectées : (A) pour le témoin standard ; (B) pour la souche PI9 ; deux taches (C et D) pour la souche BB9 et encore deux taches (E et F) pour la souche F21. (Figure III.2).

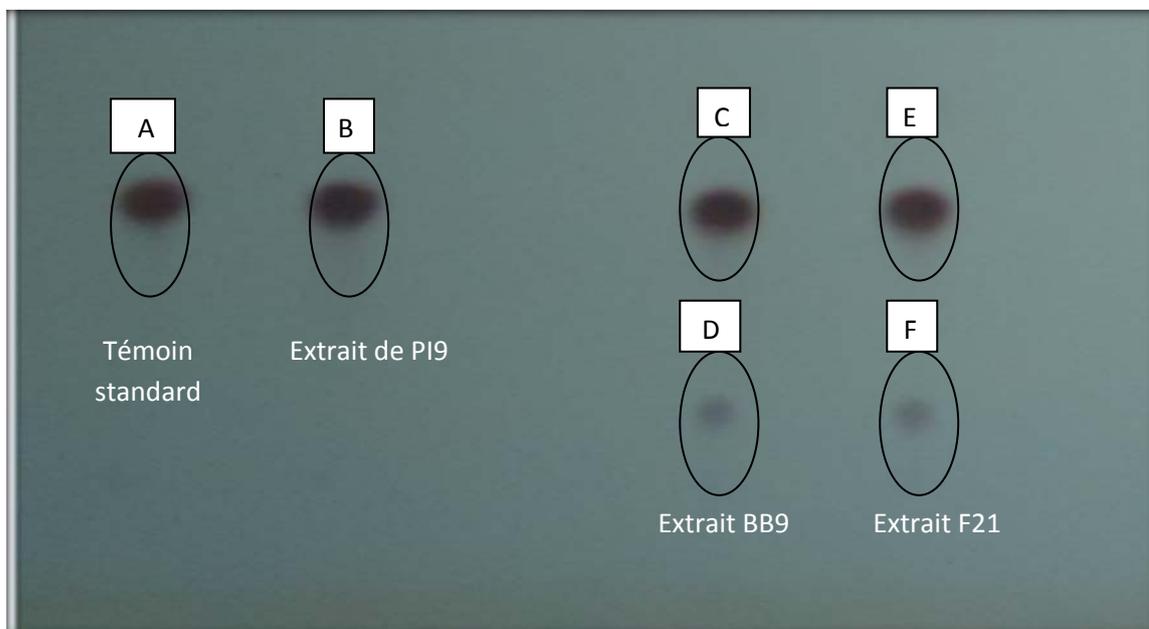


Figure III.2: Bioautographie des extraits des surnageants de cultures des souches PI9, BB9 et F21 sur AM après révélation

Pour la phase mobile chloroforme-acétone (CA), le nombre des taches détectées sont : une tache (A1) chez le témoin ; une tache (B2) chez PI9 ; une tache (C1) chez BB9 et une autre tâche chez (E1) chez F21 (Figure III.3).

La phase mobile AM a permis d'obtenir une bonne séparation des différents composés contenus dans les extraits de la souche PI9, BB9 et F21, par rapport à la phase mobile CA où la séparation n'a pu être obtenue.

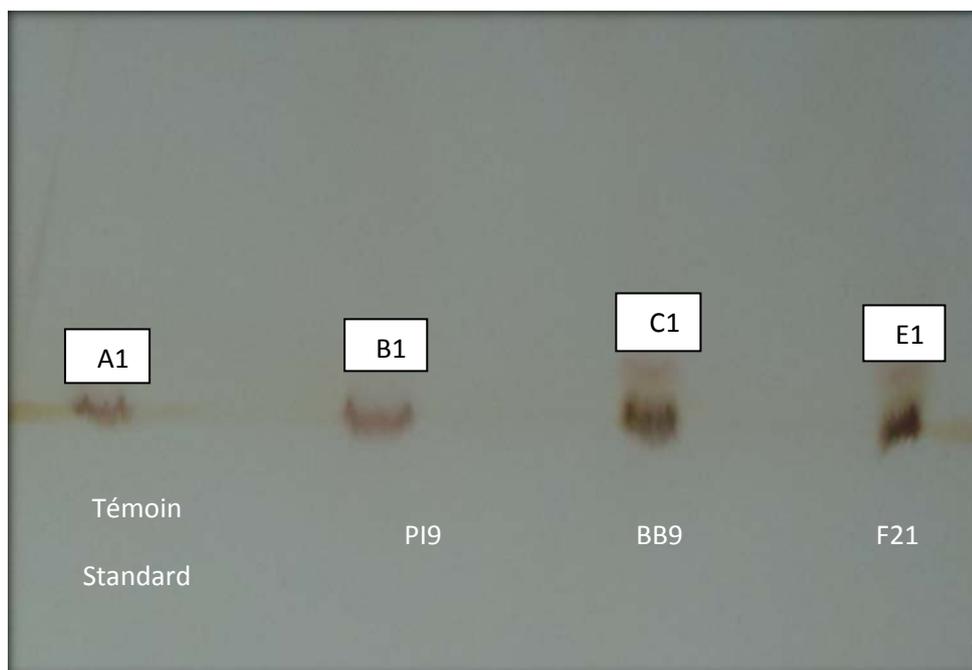


Figure III.3 : Bioautographie des extraits des surnageants de culture des souches PI9, BB9, F21 sur CA après révélation

Les résultats ont permis de retenir le premier mélange AM comme phase mobile idéale pour la séparation de différentes fractions des extraits des trois souches. Après la révélation chimique, des composés aromatiques polycycliques, les extraits de surnageant de chaque culture, sur milieu King B, ont révélé des taches actives colorées sur AM.

- La tâche du témoin correspond au composé A ($R_f = 0,90$).
- Les composés B (PI9) et E (F21) ont montré une ressemblance avec la molécule standard l'acide phénazine-1-carboxylique ($R_f = 0,90$).
- Le composé C a un Rapport frontal ($R_f : 0,87$) différent de celui du témoin, suggérant qu'il s'agit d'un autre type de composés phénaziniques.

III.3.1.6.4.3. Résultats de l'analyse par HPLC

Les composés C.B.E et le composé de la souche de référence CHAO ont été purifiés par chromatographie sur couche mince (CCM). L'identification des

phénazines a été réalisée en comparaison avec l'éluion du standard (PCA) dans les mêmes conditions expérimentales. Les différents chromatogrammes (HPLC) sont illustrés sur les figures suivantes :

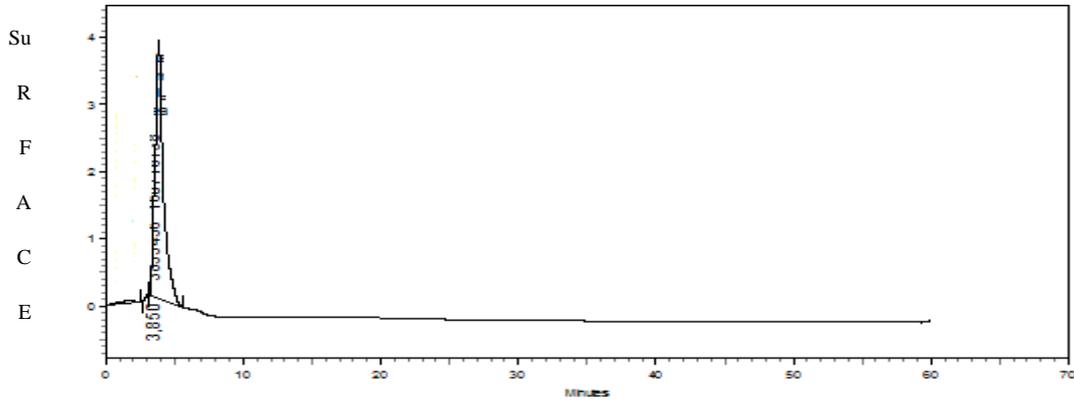


Figure III.4 : Profil d'HPLC de l'étalon

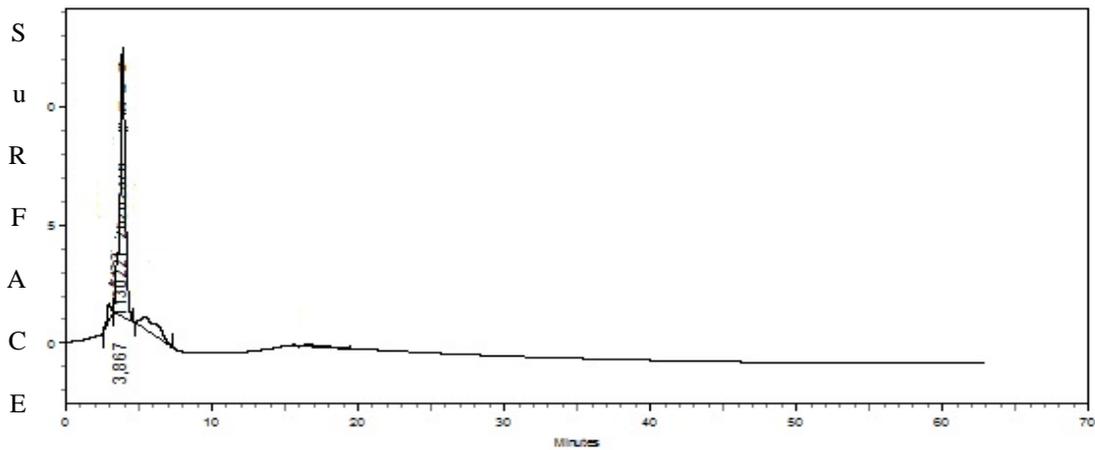
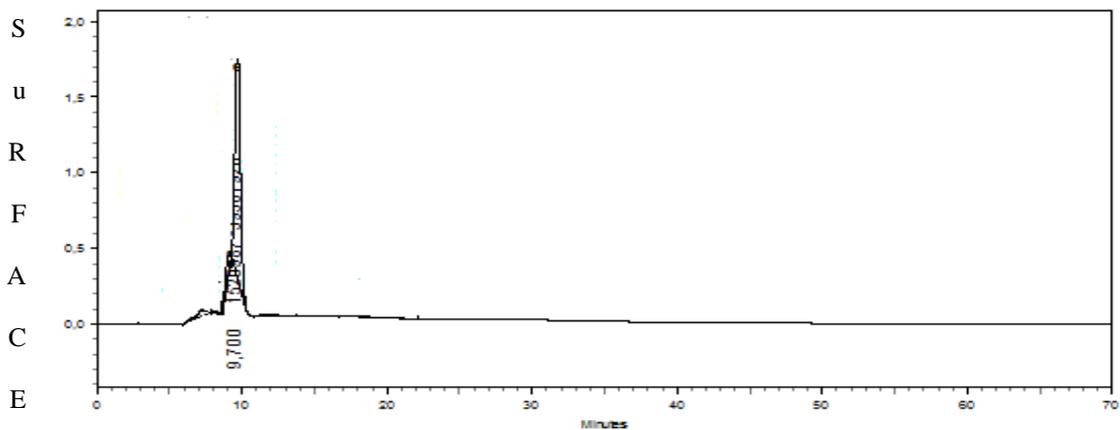
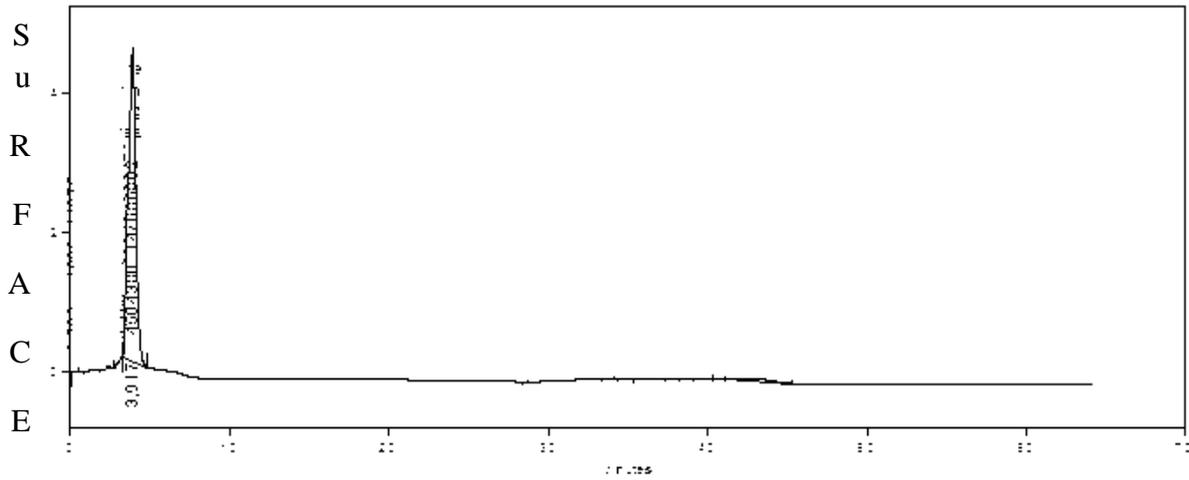


Figure III.5 : Profil HPLC après injection de l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'isolat F21



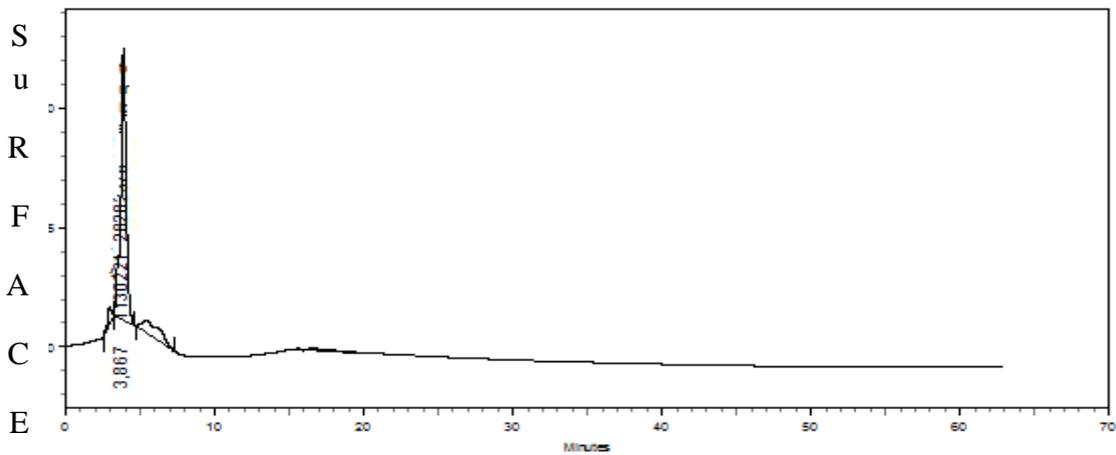
Temps de rétention (T R)

Figure III.6 : Profil d'HPLC après injection de l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'isolat BB9



Temps de rétention (T R)

Figure III.7 : Profil d'HPLC après injection de l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'isolat PI9.



Temps de rétention (T R)

Figure III.8 : Profil d'HPLC après injection de l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'isolat CHAO

La similarité entre le temps de rétention des extraits des souches PI9 (Figure III.7) et F21 (Figure III.5) avec le composé purifié de la PCA et la superposition de leur profil chromatographique avec celui de la souche de référence CHAO, révèle la présence de l'acide-1-carboxylique (PCA) chez ces isolats, en plus de la souche de référence (Figure III.8). Cependant le chromatogramme de l'isolat BB9 est différent de celui du témoin (standard). Le temps de rétention de l'acide-1-carboxylique est

localisé à 3,85 min, alors que celui du composé visible sur le chromatogramme est élué à 9,7 min (Figure III. 6).

III.3.Discussion

Nos résultats indiquent que toutes les souches, déjà sélectionnées sur la base de la synthèse d'un pigment fluorescent diffusible sur le milieu KB, synthétisent des sidérophores. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents synthétisent de nombreux sidérophores, chélateurs du fer ionique, qui exhibent des effets fongistatique et bactériostatique, tels que les pyoverdines, les pseudobactines, les pyochelines et l'acide salicylique (Bagg et Neilands, 1987). Les sidérophores ne sont produits qu'en conditions de carence en fer (Meyer *et al.*, 1995; Meyer, 2000; Chu *et al.*, 2010). Chez des souches de *P. fluorescens* et de *P. syringae*, la fluorescence, représentative des sidérophores, est réduite en présence de sels ferreux. A l'exception des lactobacilles, la quasi-totalité des microorganismes exige la présence d'ions de fer assimilables pour leur croissance (Gross, 1990). Le fer joue un rôle crucial dans la plupart des enzymes d'oxydoréduction intervenant, dans la chaîne de transport d'électrons du métabolisme intermédiaire. Malgré son abondance dans la nature, sa biodisponibilité reste extrêmement faible, les seuils de concentration ferriques à pH 7.0 ne dépassent pas 10-18 M. Pour cette raison, la majorité des organismes doivent réagir à ce problème, pour la capture et l'assimilation de fer de leur environnement (Dreschel et Winkelmann 1997). Les bactéries ont alors élaborées des systèmes de capture complexes, via la sécrétion de sidérophores et la capture des complexes ferri-sidérophores.

Les sidérophores sont parmi les composés des rhizobactéries qui ont un effet de stimulation de la croissance des plantes (PGPR) (O'sullivan et O'gara, 1992; Pieterse et Van Loon, 1999 ; Trapet *et al.*, 2016). Il a été démontré que les PGPRs améliorent la croissance végétale en produisant des sidérophores, extracellulaires très efficaces, qui permettent de lutter contre plusieurs maladies des plantes en privant l'agent pathogène de la nutrition en fer, entraînant ainsi une augmentation du rendement des cultures. En plus du fer, les sidérophores peuvent également former des complexes stables avec d'autres métaux préoccupants pour l'environnement, tels que l'Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb et Zn (Saharan et Nehra, 2011). Ces mêmes auteurs ont montré que la présence de métaux lourds induit la production de sidérophores

par ces rhizobactéries (Kumar et Sharma ,2017; Patil et al., 2017). *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas fluorescens* ont une capacité remarquable d'utiliser un large spectre de pyoverdines secrétés par d'autres micro-organismes, tandis que leurs pyoverdines ne peuvent pas être utilisés par ces derniers (Adam et al., 2017; Beneduzi et al., 2012 ; David et al., 2018).

Six souches seulement synthétisent l'AIA avec des quantités assez variables, allant de 1,7 µg/ml à 18,3 µg/ml. Cette fluctuation est probablement due à la variabilité génétique entre les souches. L'absence de production chez certaines souches serait liée donc à la perte de l'information génétique et du mécanisme physiologique de la biosynthèse de l'AIA (Mishra et al., 2010; Rabhi, 2012). La synthèse d'AIA par *Pseudomonas* est bénéfique pour la croissance et le développement végétal (Sandhya et al., 2009). Environ 80 % des bactéries rhizosphériques sont capables de produire de l'AIA (Dastager et al., 2010). L'AIA joue un rôle très important dans la division cellulaire, l'élongation des racines, la prolifération des poils absorbants et dans les mécanismes de tolérance de la plante aux stress (Sandhya et al., 2010).

La biosynthèse de l'AIA est largement répandue chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents, d'une manière prédominante à partir du tryptophane par la voie de l'acide indole-3-pyruvique (Oberhansli et al., 1991; Forlani et al., 1995; Persello-Cartieaux et al., 2003). Le L-tryptophane est considéré comme le précurseur, du fait que son adjonction est nécessaire à la production de cette hormone. Les exsudats racinaires sont une source naturelle de L-tryptophane pour la microflore de la rhizosphère (Dastager et al., 2010; David et al., 2018). La production de ce composé est variable selon les souches et les différentes espèces, ainsi que les conditions de culture des plantes, leur phase de croissance et de la disponibilité de substrats nutritifs (Miraza et al., 2001).

L'intervalle de concentrations dans lequel l'AIA exogène à la plante peut avoir des effets bénéfiques, sur la croissance et le développement racinaire, est relativement étroit. Des concentrations élevées, de l'ordre de micromoles, ont provoqué des effets négatifs ; Il a été démontré avec la souche de *Pseudomonas* CHA0 que l'élévation de la concentration en AIA exogène n'implique pas une meilleure efficacité dans l'antagonisme. En terme d'activité de biocontrôle, l'AIA semble être de moindre importance par rapport aux autres métabolites secondaires,

tels que le 2,4 diacetylphloroglucinol, la pyolutéorine, le cyanide d'hydrogène et les phénazines (Voisard *et al.*, 1989; Benchabane, 2005).

L'amélioration de l'alimentation minérale chez les plantes en phosphore a été la première hypothèse proposée pour expliquer l'effet bénéfique enregistré à la suite de leur bactérisation (Lemanceau., 1992). Même dans des sols qui en sont riches, le phosphore se trouve sous une forme insoluble : oxydes de fer et d'aluminium dans les sols acides, et oxydes de calcium dans les sols basiques, et seulement une faible proportion (0.1 %) est assimilable par les plantes (Stevenson et Cole, 1999). En plus les $\frac{3}{4}$ du phosphore apporté par les fertilisants appliqués au sol se précipitent en des formes insolubles, augmentant ainsi le besoin des cultures en cet élément (Goldstein, 1986 ; Khan *et al.*, 2010; Gupta *et al.*,2015). Les *Pseudomonas* spp. fluorescents, augmenteraient la concentration en phosphore soluble, soit par minéralisation des phosphates organiques, grâce à des phosphatases, soit par solubilisation des phosphates inorganiques, sous l'effet d'acides (Krasilnikov, 1961).

Le test de la solubilisation du phosphore, *in vitro*, a révélé que nos souches de *Pseudomonas*, l'exception de BB6, ont la capacité de solubiliser le phosphore. La solubilisation notée, indiquée par la formation d'un halo de solubilisation ou par changement de la couleur du milieu de culture, n'est pas due à une production d'acides organiques, mais plutôt à une production d'enzymes (phosphatases). Les résultats obtenus au cours de cette expérimentation concordent avec ceux ayant mis en évidence la capacité des bactéries rhizosphériques à solubiliser les phosphates (Rodriguez et Fraga, 1999 ; Verma *et al.*, 2001).

Le parasitisme et/ou la lyse des champignons par les bactéries de la rhizosphère sont facilités par la production d'enzymes hydrolytiques, qui dégradent les parois des cellules fongiques (CWDE : cell wall dedgrading enzymes). La production *in vitro* de chitinases a été retrouvée chez les dix-sept souches testées. Les chitinases, sont des enzymes hydrolytiques d'importance primordiale, car la chitine est le constituant majeure de la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes (Kishore *et al.*, 2005). Plusieurs études ont relaté une corrélation entre la production d'enzymes chitinolytiques par des bactéries de genre *Pseudomonas* sp et leur pouvoir inhibiteur de la croissance de divers champignons telluriques, tel que *Fusarium oxysporum* (Lim *et al.*, 1991; Palumbo *et al.*, 2005). L'absence de l'inhibition chez certaines souches peut être expliquée par la production de quantités insuffisante pour l'activité inhibitrice.

En plus des chitinases, les *Pseudomonas* produiraient d'autres types d'enzymes lytiques, en l'occurrence des protéases. Nos résultats montrent que 63,15 % des souches sont positivement protéolytiques. D'après Stanier *et al.*, (1966), la production de protéases extracellulaires, est une caractéristique chez *P. aeruginosa* et *P. fluorescens*, mais absente chez *P. putida* et qui sont impliquées dans la dégradation des composés structuraux des parois cellulaires fongiques.

La production de cellulases est négative chez toutes les souches testées. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que la dégradation de la cellulose est complexe ; elle nécessite l'action synergique de trois catégories d'enzymes. En effet, seuls quelques organismes ont la capacité de produire de grandes quantités d'enzymes de dégradation de la cellulose insoluble, en sucres solubles *in vitro*. Les trois groupes enzymatiques du complexe de cellulase sont respectivement : endo- β (1-4) glucanases, exo- β (1-4) glucanases et β -glucosidases (Mandels, 1981). Il semble qu'une petite proportion des dérivés de la cellulose, pas entièrement réticulés, qui sont présents sous forme soluble. Le même auteur confirme que la totalité de la chaîne de cellulose substituée est complètement réticulé et que jusqu'à 10 % peuvent être sous une forme soluble. Ceci suggère que l'importante fraction insoluble est la cause de cette activité limitée.

Les résultats de notre étude, sur la production de substances volatile (HCN), ont montré que parmi les 17 souches, 16 souches (94.11%) ont montré une cyanogénèse positive. Une différence existe entre les souches en termes d'intensité de production de l'HCN. Celle-ci revient à la variabilité d'expression des gènes responsables chez les *Pseudomonas* producteurs. La production d'HCN de nos souches se présentent en deux groupes : faibles producteurs (6 souches) et forts producteurs (10 souches), en plus des souches de référence). L'absence de production chez BB2 serait due à la perte ou l'absence des gènes responsable de la biosynthèse (Ramette *et al.*, 2003). La production de l'HCN par les *Pseudomonas* est impliquée dans la suppression de différents agents pathogènes, en agissant directement sur les cellules en bloquant les cytochromes oxydases dans la chaîne respiratoire (Blumer et Haas, 2000).

Bien que la plupart des études menées dans le passé aient suggéré un rôle certain du HCN dans le contrôle biologique des phytopathogènes, d'autres études divergent de cet avis. Il a été rapporté que l'HCN est plus impliqué dans la chélation des métaux, augmentant ainsi la disponibilité du phosphate pour la plante, plutôt que

le contrôle biologique des phytopathogènes (Rijavec et Lapanje, 2017 ; Mishra et Arora, 2017).

Dans la présente étude sur l'effet antagoniste des souches de *Pseudomonas* fluorescents vis-à-vis de différents isolats fongiques et bactériens, les résultats reflètent clairement que les 17 souches testées ont la capacité inhérente à induire des effets antagonistes sur la croissance mycélienne et par conséquent sur la prolifération de ces champignons et de même sur la croissance des bactéries phytopathogènes. Les taux d'inhibition, toutefois, varient selon les souches de *Pseudomonas* testées et selon le champignon ou la bactérie phytopathogène cible.

Chez les souches antagonistes, il a été procédé à la détection de la synthèse de phénazines ou de leurs analogues. Trois souches (PI9, BB9, F20) ont révélé des zones sombres autour des colonies traduisant la production de composés apparemment phénaziniques à effet antibiotique. D'après nos résultats, ces derniers montrent un fort effet antagoniste, notamment en observant les deux souches de référence B454 et CHAO.

Les trois souches suspectées productrice de phénazines ont fait l'objet d'une étude antimicrobienne sur trois milieux de cultures. Les activités antagonistes sont d'un spectre d'action proche de celui des cinq souches (PI9, BB9, F20, B454, CHAO) de *Pseudomonas*. Il s'agit d'un spectre large touchant aussi bien les champignons que les bactéries, Gram positif ou Gram négatif. Ceci pourrait suggérer la présence chez une même souche de nombreux métabolites variables, selon le milieu de culture utilisé. La production de métabolites secondaires impliqués dans l'antagonisme microbien est sous l'effet du milieu de culture (Meyer et Abdallah, 1978). L'activité antagoniste *in vitro* dépend non seulement des espèces et souches testées, mais aussi de la composition du milieu de culture (Digat, 1992). Le pouvoir antimicrobienne des souches PI9, BB9, F21 est meilleur sur le milieu King B. Ces résultats sont proches de ceux obtenus par Benchabane (2005) et Reddy Battu et Reddy (2009). En effet, le milieu King B était le meilleur pour la production des métabolites efficaces. Les inhibitions constatées peuvent être le résultat d'un antagonisme exercé par les molécules à activité antimicrobienne, produites par les souches PI9, BB9, F21 diffusibles dans le milieu de culture. Ce phénomène est communément appelé : antibiose (Baker et Cook, 1974).

Les métabolites secondaires isolés chez ces microorganismes, qui provoquent une activité antimicrobienne (antibactérienne, antifongique ou antiprotozoaire), et/ou

antivirale, peuvent être considérés à titre d'antibiotiques (Berdy, 2005). La synthèse des antibiotiques est étroitement liée au métabolisme cellulaire, qui est à son tour liée à la disponibilité en éléments nutritifs (minéraux, sources de carbone...) et autres stimuli environnementaux (pH, température (Thomashow, 1996; Bender et al., 1999). Thomashow et Weller (1990), révèlent dans leur première démonstration expérimentale, utilisant une approche génétique, l'implication d'un antibiotique produit par une souche de *Pseudomonas* dans la suppression d'agents phytopathogènes. Ils ont utilisé une souche de *P. fluorescens* productrice d'acide phénazine carboxylique, isolée de la rhizosphère du blé et qui est fortement antagoniste envers *Gaeumannomyces graminis var tritici*. Ce type de démonstration a été réalisé également avec d'autres composés, comme le DAPG, la pyrrolnitrine, la pyoluteorine et le HCN (Haas et Keel, 2003).

Les composés à effet antibiotiques phénaziniques secrétés dans les différents milieux de culture par les souches PI9, BB9, F21 ont fait l'objet d'extraction par trois solvants de polarité différentes : acétate d'éthyle, le dichlorométhane et l'hexane. L'efficacité de ces solvants a été déjà rapportée dans l'extraction de phénazines (Gurusiddiah et al., 1986). Parmi ces solvants l'acétate d'éthyle a permis l'obtention de meilleurs résultats. En utilisant le témoin PCA (standard), la comparaison des résultats des deux techniques chromatographiques (CCM et HPLC) avec les composés issus des souches PI9 et F21, additionnée à la vérification de leur activité antimicrobienne, a permis de mettre en évidence et d'identifier la PCA comme composé actif. La souche BB9 possède une activité antimicrobienne marquée et produit des composés de nature phénazinique, mais sa composition diffère de celle du PCA produit par les autres souches.

La souche PI9 apparaît la plus performante, parmi les autres souches sélectionnées et productrice des phénazines. Cela se traduit par une activité antimicrobienne beaucoup plus marquée accompagnée d'une production plus importante en PCA.

Les antibiotiques de type PCA et autres phénazines sont les déterminants majeurs dans le contrôle biologique des phytopathogènes telluriques chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents (Thomashow et Weller, 1996). La production de phénazines est impliquée aussi bien dans la survie de la bactérie que dans l'inhibition du pathogène. Ces antibiotiques sont produits vers la fin de la phase exponentielle et pendant la phase stationnaire (Turner et Messenger, 1986).

Nos résultats montrent que les souches productrices des composés phénaziniques, à effet antibiotique, ont provoqué des taux d'inhibition très élevés en interaction avec *G. graminis* var. *Tritici*, allant jusqu'à 50 %. Thomashow et ses collaborateurs (1990), ont trouvé que les antibiotiques produits sur les racines saines, et plus spécifiquement la PCA, pourrait servir comme une importante première ligne de défense contre l'infection primaire par *G. graminis* var. *Tritici*.

Les phénazines chez *Pseudomonas* joueraient un rôle important dans la lutte biologique contre les maladies infectieuses des plantes (Thomashow et Weller, 1988 ; Thomashow et al., 1990). Il est intéressant de noter dans notre cas que les composés majoritaires extraits à partir des souches PI9, BB9, F21 qui semblent appartenir au groupe des phénazines. Ces derniers jouent aussi un rôle dans la compétition rhizosphérique, incluant la survie et la compétence des bactéries productrices (Mazzola et al., 1992).

Chen et al., (2012) ont indiqué que PHZ joue un rôle dans le métabolisme et le transfert d'énergie, fonctionnant comme une navette électronique. De nouvelles connaissances ont récemment été rapportées pour la production de PHZ substituée (Guttenberger et al., 2017). Bien que quelques produits anti-phytopathogènes à base de PHZ sont maintenant disponibles sur le marché (Zhou et al., 2015), mais pour le succès commercial et l'utilisation généralisée de ce métabolite très efficace, il est nécessaire de sélectionner des souches performantes et efficaces (Mishra et Arora, 2017; Jeyanthi et Kanimozhi, 2018).

Bien qu'il est admis aujourd'hui que les rhizobactéries, particulièrement les PGPRs peuvent engendrer des gains appréciables, il demeure toujours que leur application sur terrain rencontre des difficultés. Parmi ces obstacles, le processus de formulation et les méthodes d'applications restent les garants de leur adoption et de l'élargissement de leur emploi.

Chapitre IV: Formulation de rhizobactéries par lyophilisation

Chapitre IV : Formulation de rhizobactéries par lyophilisation

IV.1. Introduction

Après des décennies de recherche en développement de produits biologiques, intégrés dans la gestion des productions agricoles, il en demeure qu'actuellement les préparations à base d'entités microbiennes occupent une place de choix. Ainsi il est devenu possible de recourir à l'application de micro-organismes en tant que biofertilisants pour améliorer la croissance des plantes, et en tant que biopesticides pour gérer les maladies et les ravageurs des plantes. L'intérêt de ces préparations microbiennes est d'autant plus important dans les stratégies de contrôle des parasites biotiques insidieux, notamment les agents phytopathogènes (Spadaro et Gullino, 2005 ; Liu et *al.*, 2014; Bisutti et *al.*, 2015).

Les résultats, de nombreux laboratoires de recherches, ont mis en évidence expérimentalement l'existence de divers microorganismes doués de potentialités phytobénéfiques, néanmoins le passage à leur application sur terrain rencontre beaucoup d'obstacles technologiques, dont la formulation adéquate semble le principal. Par rapport aux spécialités chimiques, la situation actuelle est loin d'être concurrentielle.

Le processus de formulation est une étape primordiale dans le développement des agents de lutte biologique, quand les microorganismes sont transformés de produits testés en laboratoire à des produits appliqués sur le terrain (Liu et *al.*, 2014).

Une application microbienne réussie dépend de la mise au point d'une formulation appropriée et économiquement réalisable. Les formulations doivent fournir un produit final ayant une efficacité optimisée (Bora et *al.*, 2004), une méthode d'application conviviale et une longue stabilité au stockage (Costa et *al.*, 2002; Selvaraj et *al.*, 2014).

Généralement, les formulations se présentent sous forme liquide, en poudre ou granulaire et contiennent des additifs pour améliorer leurs propriétés physiques et faciliter leur application. La lyophilisation est souvent sollicitée dans les procédés de conception des inoculats microbiens.

L'objectif de ce chapitre est double : (i) Tenter de concevoir des formulations à base de souches bactériennes sélectionnées en étudiant l'impact de la lyophilisation. (ii) Evaluer la viabilité des formulations obtenues après stockage de longue durée.

IV.2. Matériel et méthodes

IV.2.1. Test de résistance à la température

Le test de résistance aux températures a été réalisé avec les dix-sept souches de *Pseudomonas* sélectionnées, précédemment, en fonction de leur identité (cf. chapitre II), de leur pouvoir antagoniste et de production de métabolites secondaires (cf. chapitre III). Ce test permettra le criblage de souches pouvant croître relativement, aux températures élevées, leur permettant de tolérer ou de résister aux conditions de séchage, durant les procédés de formulation, en vue d'une conservation optimale, compatible avec la préservation d'une viabilité maximale.

Le test a été réalisé en milieu KB liquide en fioles de 50 ml sous agitation continue (50 rpm, 48 h), incubées séparément, aux températures : 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55°C et 60 °C. La croissance bactérienne a été évaluée, sur milieu KB en boîte de Pétri, à 30°C entre 24 h et 48 h (Coulibaly et *al.* 2010).

IV.2.2. Analyse des acides gras par Chromatographie gaz - liquide

Les souches présentant des aptitudes à croître aux températures élevées ont subi des analyses des acides gras, afin de déterminer leur composition qui peut expliquer, éventuellement, cette tolérance thermique. Selon la méthode appliquée par Coulibaly et *al.*, (2010), les acides gras cellulaires sont extraits dans un mélange éthanol-éther (3/1; v/v) à partir d'1 g du culot. La biomasse cellulaire est reprise dans 10 ml d'une solution de lysozyme à 0,8 mg/ml et laissée en incubation pendant 20 minutes à 37°C.

Après incubation, le mélange est centrifugé à 4000 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans 10 ml de mélange éthanol-éther (3/1) puis mis sous agitation continue dans un agitateur rotatif pendant 3 heures. Après filtration (filtre plissé), le filtrat est évaporé et repris dans 0,2 ml d'hexane et 0,5 ml de réactif au méthanol-BF₃ (méthanol, méthanol-BF₃, hexane ; 55:25:20). Les tubes, hermétiquement fermés sont placés dans un bain Marie à 70°C pendant 90 minutes. Après la transestérification, on ajoute successivement et après une légère agitation, 0,5 ml d'une solution saturée en NaCl, 0,2 ml de H₂SO₄ (10%) et 1 ml d'hexane. Les tubes sont agités vigoureusement et laissés au repos pendant 5 minutes. La couche supérieure est prélevée pour injection en chromatographie gazeuse (CPG).

L'analyse CPG des acides gras cellulaires, extraits à partir des culots des différentes souches, a été réalisé sur une colonne de type ECWAX avec un

détecteur FID à 250 °C. Un standard d'esters méthyliques a été injecté afin de déterminer les temps de rétention correspondants aux différents esters méthyliques existants. Les acides gras des différents échantillons sont identifiés par comparaison avec les temps de rétention des produits témoins (Coulibaly et *al.*, 2009; Mputu Kanyinda et *al.*, 2012).

IV.2.3. Procédé de formulation

IV.2.3.1. Cultures bactériennes en fermenteur

Des précultures (5 l), de 24 h obtenues en milieu KB liquide après d'incubation à 30 °C, ont été inoculées dans des bioréacteurs (100 l) (Biolafitte, Artechno, Liège - Belgique), contenant 60 l du milieu 863. L'aération est effectuée par barbotage d'air à un débit de gaz initial de 1 vvm. La saturation de l'air est contrôlée par régulation automatique de la vitesse d'agitation (100 à 150 trs/mn) et en fonction de la vitesse de consommation d'oxygène. En maintenant le pH à 7, la croissance cellulaire (culture de 16 h) a été évaluée par la densité optique (DO) à 540 nm (spectrophotomètre V-1200). Les cellules ont été récoltées puis concentrées 20 fois par centrifugation (Sorval RC 12 BP) à 4700 rpm pendant 20 mn à 4 °C (Yao et *al.* 2008).

IV.2.3.2. Lyophilisation et Conservation

Les culots, obtenus après centrifugation, ont été divisés en deux parties égales : Une partie est mélangée avec le composé protecteur (1% de glycérol et 5% de maltodextrine) (Mputu Kanyinda et Thonart, 2013) et l'autre est appliquée directement. Les échantillons ont été congelés pendant 24 h et lyophilisés pendant 72 heures dans un lyophilisateur (Louw Koeltechnik Bvba) selon le programme standard (temps de séchage primaire de 6 h ; la température de condenseur de - 45 °C). Pour l'échantillon final, la température était de 25 °C, en élevant la température progressivement de - 45°C à 25 °C à 0,9 mbar. Les lyophilisats obtenus sont scellés sous vide dans des sachets en aluminium (250 g) et stockés à 4 °C.

IV.2.4. Viabilité des bactéries

La viabilité des souches bactériennes a été déterminée avant et après lyophilisation et après stockage, par dénombrement sur milieu KB (King et *al.*, 1954) et par cytométrie en flux.

IV.2.4.1. Dénombrement

Un gramme de chaque lyophilisat a été réhydraté dans 9 ml d'eau peptonée. Après une série de dilutions, 100 µl ont été étalées sur des géloses KB (King et *al.*,

1954), en trois répétitions. Le nombre de colonies a été déterminé après 24 h d'incubation à 28 °C (Coulibaly et al. 2009). Le taux de survie a été exprimé en unités formant colonies (UFC) par gramme après lyophilisation (Nf) et avant lyophilisation (N0) :

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

Chaque valeur exprime la moyenne de trois répétitions.

IV.2.4.2. Cytométrie en flux

Le Carboxy fluorescein diacétate (CFDA) a été utilisé pour évaluer la viabilité des bactéries, tandis que l'iodure de propidium (PI) permet de quantifier les cellules endommagées et/ou mortes. Avant la coloration, les cellules bactériennes ont été diluées dans de l'eau peptonée (DO 0,2 à 590 nm) et centrifugées (2 mn à 12.000 rpm). Les culots ont été remis en suspension, dans 1 ml d'une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) pour atteindre 10^6 cellules/ml. 1 ml de la dilution a été supplémenté avec 10 µl de PI, après incubation de 15 min à 37 °C, 10 µl de CFDA ont été rajoutés et incubés (30 mn à 37 °C) pour l'évaluation de l'intégrité de la membrane cellulaire (Rault et al., 2007).

Après centrifugation (Fischer Bioblock Scientifik; 3 mn à 12.000 rpm) et élimination du surnageant, le culot a été lavé avec 1 ml du tampon PBS et remis en suspension dans 1 ml de PFA (Paraformaldéhyde) pour fixer les cellules. Après une autre centrifugation (12.000 rpm, 3 mn), le culot est remis en suspension dans 1 ml de tampon PBS et stocké à 4°C, avant analyse par cytométrie en flux (Rault et al., 2007).

IV.3. Résultats

IV.3.1. Résistance à la température

Le tableau ci-dessous montre les résultats préliminaires de sélection de 17 souches de *Pseudomonas* ayant pu se développer aux températures comprises entre 35 °C et 45 °C. En plus de leurs activités antagonistes *in vitro* et la capacité à produire des métabolites, impliqués dans le biocontrôle et la phytostimulation, les souches retenues (BB2, BB9, BB10, F21, PI9 et GP4) se développent même à 45° C (Tableau IV.1).

Tableau IV.1 : Croissance des souches de *Pseudomonas* aux températures testées.

Souches	Croissance à 35, 40, 45 °C	Souches	Croissance à 35, 40, 45 °C
BB6	+ + + -	F20	+ + + -
F21	+ + + +	F19	+ + + -
F23	+ + + -	F8	+ + + -
BB10	+ + + +	GP4	+ + + +
BT7	+ + + -	BT5	+ + + -
BB9	+ + + +	BT3	+ + + -
PI11	+ + + -	BB7	+ + + -
PI9	+ + + +	BB2	+ + + +
F48	+ + + -	BS4	+ + + -
F43	+ + + -	F25	+ + + -
F27	+ + + -		

+ : Croissance - : Pas de croissance, en gars souches retenues

IV.3.2. Analyse des acides gras cellulaires (AGC)

L'étude de la composition membranaire en acides gras a été effectuée sur les souches bactériennes retenues (BB2, BB9, BB10, F21, PI9 et GP4) ayant pu se développer à 45 °C. Six principaux acides gras ont été identifiés, à savoir les acides palmitique (C16 :0), palmitoléique (C16 :1), stéarique (C18 :0), oléique (C18 :1), linoléique (C18 :2) et l'acide linoléique (C18 :3). Les résultats montrent de faibles taux en acides gras insaturés (C18 :2 et C18 :3) voir nulle chez F21 pour l'acide linoléique (C18 :2) et chez BB2, F21, et PI9 pour l'acide linoléiques (C18 :3) en comparant avec les taux d'acides gras saturés (C16 :0 et C18 :0) présents dans les membranes cellulaires de la plupart des souches sélectionnés (Tableau IV.2).

Les taux les plus importants en acide gras saturés ont été obtenus avec l'acide palmitiques (C16 :0). Les taux varient de 43,32 % à 59,01 % enregistrés, respectivement, chez les souches F21 et BB9.

Tableau IV.2 : Composition en acides gras cellulaires (AGC)

Souches	Acides gras cellulaires (Pourcentages des pics)					
	C16 :0	C16 :1	C18 :0	C18 :1	C18 :2	C18 :3
BB2	49,32±0,64 ^a	21,39 ±0,85	13,80±0,02	14,54±0,57	0,96±0,01	0,00 ±0,00
BB10	54,00±2,90	23,14±1,98	1,96±1,20	17,30±2,05	0,70±0,21	2,91±1,91
F21	43,32±0,77	34,71±2,19	5,18±1,68	16,79±2,33	0,00±0,00	0,00±0,00
PI9	48,18±0,45	25,34±0,14	11,78±0,13	14,23±0,11	0,47±0,13	0,00±0,00
GP4	50,63±2,97	23,31±1,13	4,10±1,63	18,64±3,49	0,65±0,78	2,66±1,34
BB9	59,01±3,61	14,61±3,25	8,19±1,98	06,95±3,32	05,45±0,57	05,79±0,64

Acides gras : palmitique (C16 : 0), pamiloléique (C16 :1), stéarique (C18: 0), oléique (C18: 1), linoléique (C18: 2) et linoléique (C18: 3). a : Ecart type issu de trois répétions.

IV.3.3. Viabilité des lyophilisats bactériens

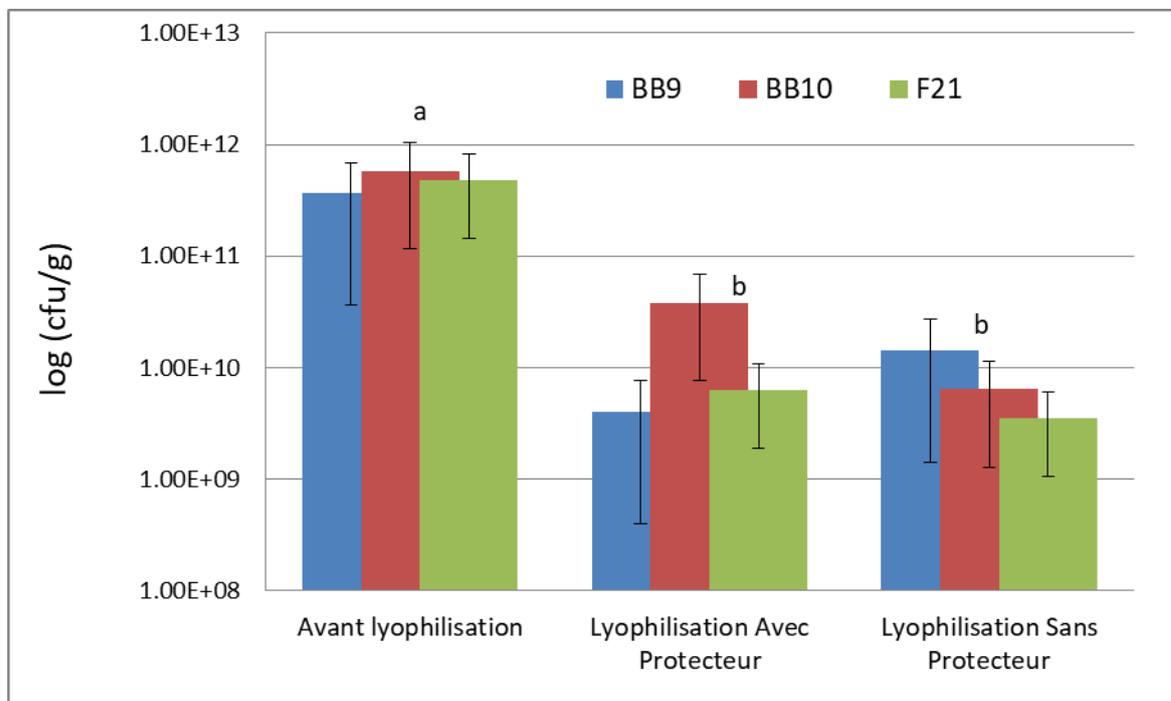
IV.3.3.1. Dénombrement bactérien

Les résultats de formulation, de trois souches de *Pseudomonas*, montrent que la viabilité évaluée par dénombrement sur gélose KB a beaucoup diminué après lyophilisation. Les taux de viabilité variaient entre 1.10% à 6.51% enregistrés, respectivement, chez les lyophilisats des souches BB9 et BB10 additionnés d'agents protecteurs (glycerol+maltodextrine). Ces mêmes souches présentent des taux de viabilité plus faibles, variant entre 00,39% à 01,09%, en l'absence d'une cryoprotection. Donc, l'utilisation de composés protecteurs, additionnés avant la lyophilisation, a permis de maintenir une viabilité notable, en comparaison avec les même souches lyophilisées sans agents protecteurs (Tableau IV.3, Figure IV.1).

Tableau IV.3 : Effets de la lyophilisation et de la cryoprotection sur la viabilité (%).

Souches	Avant lyophilisation (cfu/g)	Après lyophilisation (cfu/g)	
		AP (avec protecteur)	SP (sans agent protecteur)
BB9	$3,63 \cdot 10^{11} (\pm 6,03 \cdot 10^{10})^a$	$4,00 \cdot 10^9 (\pm 2,00 \cdot 10^9)^a$ (01.10) ^b	$1,43 \cdot 10^{10} (\pm 1,97 \cdot 10^{10})$ (00.39)
BB10	$5,83 \cdot 10^{11} (\pm 7,64 \cdot 10^{10})$	$3,80 \cdot 10^{10} (\pm 8,54 \cdot 10^9)$ (06.51)	$6,40 \cdot 10^9 (\pm 7,94 \cdot 10^8)$ (01.09)
F21	$4,80 \cdot 10^{11} (\pm 7,55 \cdot 10^{10})$	$6,33 \cdot 10^9 (\pm 2,52 \cdot 10^9)$ (01.31)	$3,53 \cdot 10^9 (\pm 7,57 \cdot 10^8)$ (00.73)

a : écart type issu de trois répétions b : Viabilité (%) des cellules lyophilisées et stockées 4°C.



Les barres avec la même lettre ne diffèrent pas significativement, selon le test de Newman-Keuls ($\alpha=5\%$)

Figure IV.1 : Densités bactériennes avant lyophilisation et après formulation.

IV.3.3.2. Cytométrie en flux

L'échantillon témoin (A04bb9), a été placé à l'étuve (105 °C, 30 mn) pour tuer les bactéries, afin d'avoir une idée sur les dommages que l'on peut voir avec la cytométrie en flux. Le constat est que plus de 91% des cellules sont mortes pendant l'exposition à la chaleur. Après la coloration à l'Iodure de Propidium (PI) et au

diacétate de carboxyfluorescéine (cFDA) ; nous avons relevé que 3,1% des cellules sont endommagés (se trouvant dans un état intermédiaire entre vie et mort). 5,3% des cellules bactériennes n'ont pas pu être marquées et moins de 0,2% des cellules ont résistées. Le temps d'incubation du colorant ayant donné le bon résultat est de 15 minutes. Ainsi, ce temps a été reconduit pour la suite de nos analyses. Ce résultat nous permet de traiter nos différents échantillons, en état de crème bactérienne ou en poudre lyophilisée, afin de noter la résistance que présenteraient ses souches.

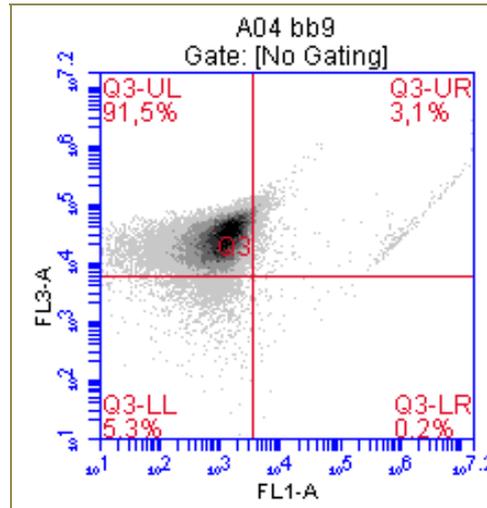
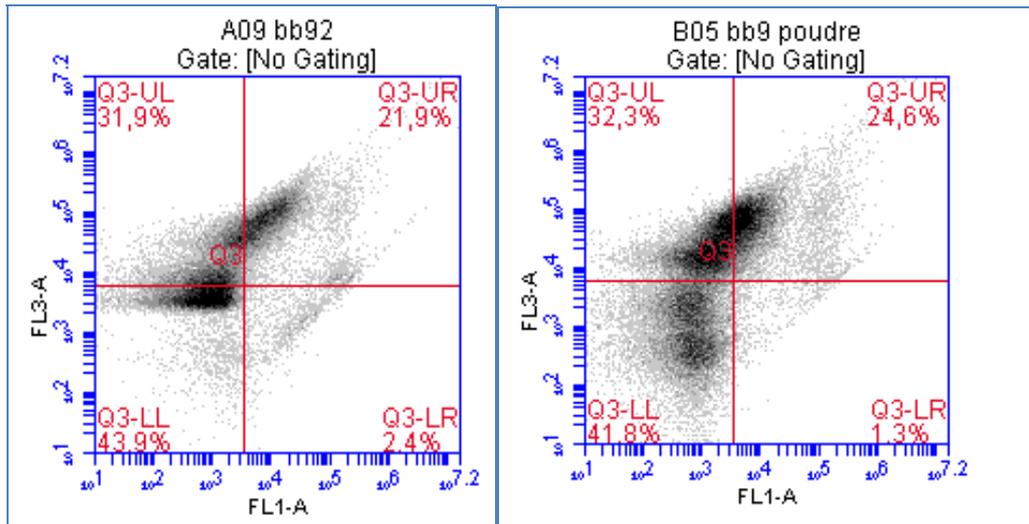


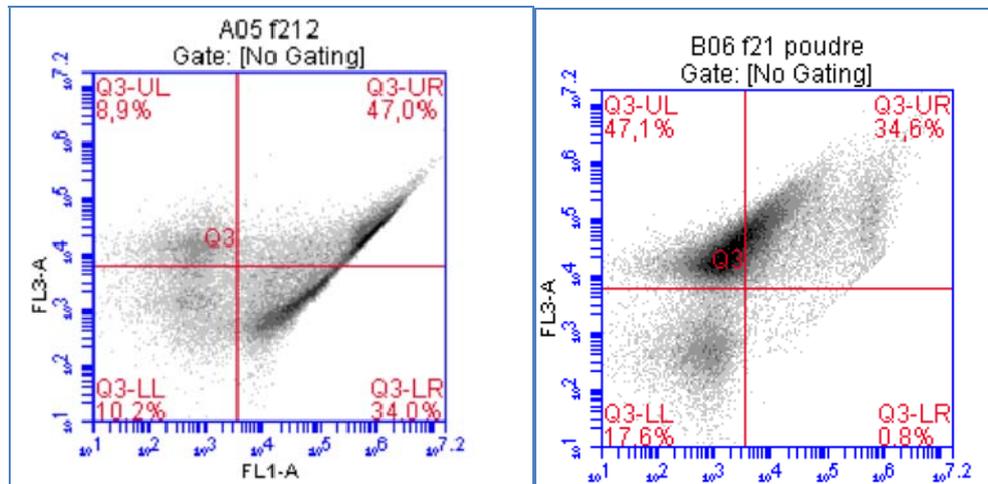
Figure VI.2 : Viabilité du Témoin (A04-BB9) en cytométrie en flux

La viabilité des trois souches bactériennes lyophilisées a été comparée aux résultats de la cytométrie en flux qui permet, après une double coloration par PI et cFDA, la détermination de l'état physiologique cellulaire (cellules viables, cellules mortes et cellules viables mais non cultivables). Il apparaît que la souche F21 est la plus sensible à la lyophilisation. Cette sensibilité s'est traduite par une importante diminution de la concentration des cellules viables (de 34 % à 0,8%). Les résultats montrent également que la lyophilisation entraîne une quantité importante en nombre de cellules intermédiaires, que l'on peut récupérer sur un milieu adéquat, pour les souches BB9 et F21 (24,6% et 34,6%) (Figure IV.3).

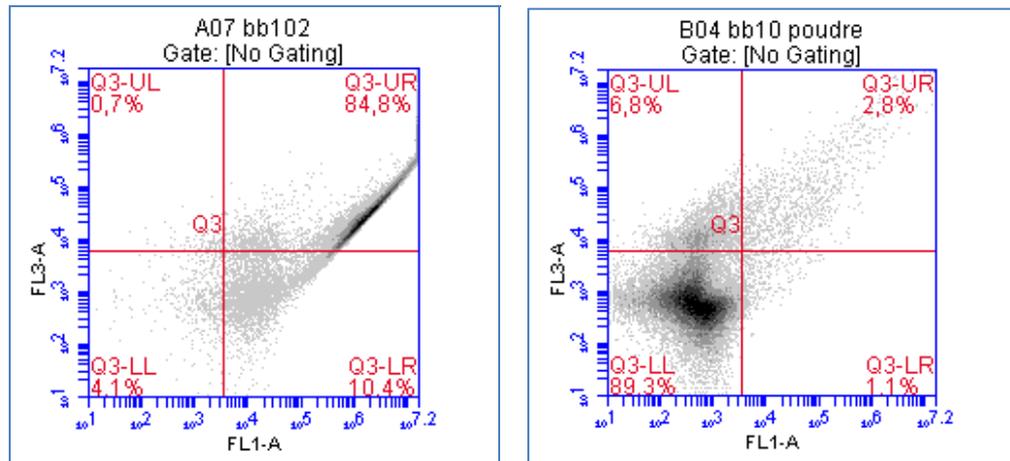
BB9



F21



BB10



Q3-UR: Cellules endommagées ; Q3-UL: Cellules mortes ; Q3-LR: Cellules vivantes ; Q3-LL: Non marquée

Figure IV.3 : viabilité (%) avant et après lyophilisation par cytométrie en flux.

IV.3.3.3. Viabilité des lyophilisats après stockage

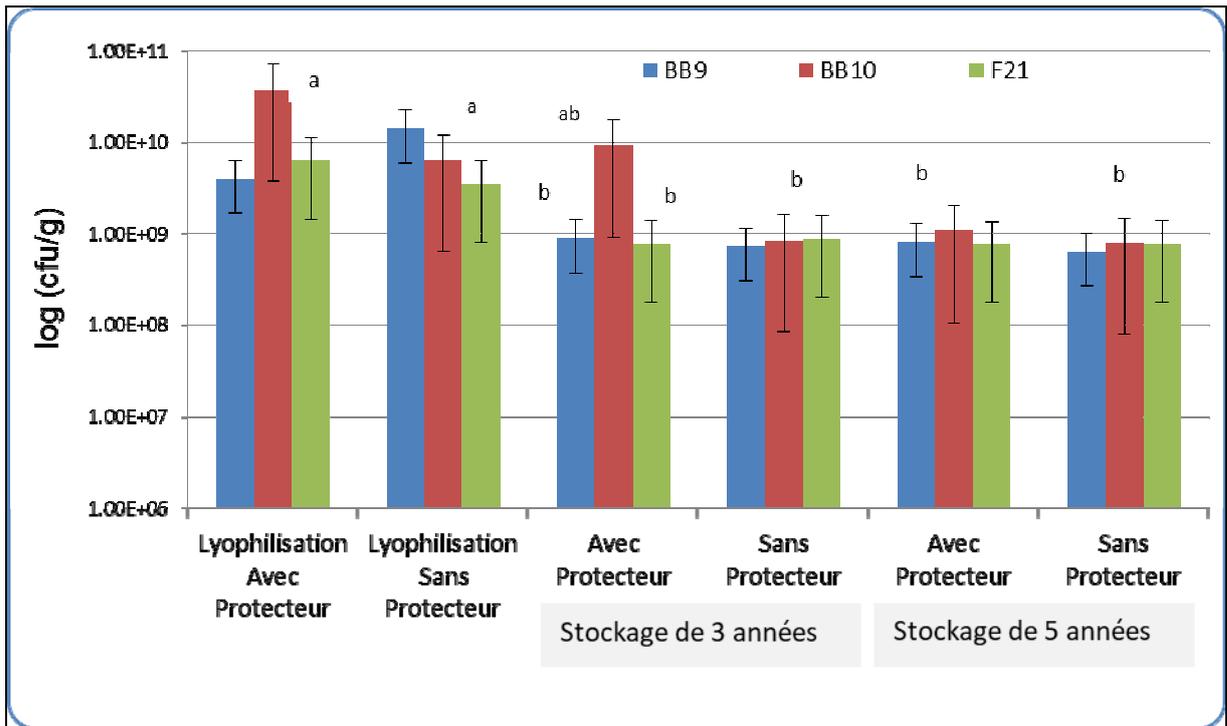
Dans les essais de stockage des lyophilisats, avec et sans cryoprotection, les souches se sont montrées très sensibles au séchage et qu'il n'y a pas d'effets notables des agents protecteurs lors de la lyophilisation. Cependant, les cryoprotecteurs peuvent influencer, relativement, la stabilité des préparations microbiennes séchées lors du stockage. En effet, les taux de viabilité enregistrés sont relativement variables (13,28% et 25,21 %), respectivement, avec les souches BB9 et F21, lyophilisées et stockées pendant cinq années à 4°C (Tableau IV.4).

La viabilité des souches de *Pseudomonas* a légèrement diminué après stockage. Le taux de survie varie entre 2,84% à 20,05% enregistrés, respectivement, avec les souches BB10 et BB9 lyophilisées avec protecteur. Ce taux est entre 4.27% à 22.09%, respectivement, pour les souches BB9 et F21 lyophilisées sans protecteur. L'addition de composés protecteurs, avant la lyophilisation, a permis de maintenir une meilleure viabilité à la fin de la procédure. Il a été constaté, à travers nos résultats, que la viabilité des produits bactériens lyophilisés restait relativement stable après stockage que ce soit après 3 ou 5 années (Tableau IV.4, Figure IV.4).

Tableau IV.4 : Viabilité (%) des souches de *Pseudomonas* après stockage à 4° C.

Souches	Avant stockage		Après 3 ans de stockage		Après 5 ans de stockage	
	AP	SP	AP	SP	AP	SP
BB9	4,00.10 ⁹ ^a	1,43.10 ¹⁰	9,00.10 ⁸ ^a	7,37.10 ⁸	8.2. 10 ⁸	6.4.10 ⁸
	(± 2,00.10 ⁹) ^b	(± 1,97.10 ¹⁰)	(± 2,00.10 ⁸) ^b	(± 4,73.10 ⁷)	(±1.24.10 ⁸)	(± 1.16.10 ⁸)
BB10	3,80.10 ¹⁰	6,40.10 ⁹	9,30.10 ⁹	8,50.10 ⁸	1,08.10 ⁹	7.9.10 ⁸
	(± 8,54.10 ⁹)	(± 7,94.10 ⁸)	(± 5,29.10 ⁸)	(± 1,22.10 ⁹)	(±2,57.10 ⁸)	(± 1.16.10 ⁸)
F21	6,33.10 ⁹	3,53.10 ⁹	7,77.10 ⁸	8,90.10 ⁸	7,66.10 ⁸	7.8.10 ⁸
	(± 2,52.10 ⁹)	(± 7,57.10 ⁸)	(± 2,08.10 ⁸)	(± 1,00.10 ⁷)	(± 2,73.10 ⁸)	(± 1.75.10 ⁸)
			(12.27)	(25.21)	(12) ^b	(22.09)

AP : avec protecteur ; **SP** : sans protecteur ; **a** : Viabilité par dénombrement (cfu/g) ; **b** : écart type issu de trois répétitions ; **c** : Viabilité (%) des cellules lyophilisées et stockées 4°C ;



Les barres avec la même lettre ne diffèrent pas significativement, selon le test de Newman-Keuls ($\alpha=5\%$)

Figure IV.4 : Viabilité (%) des souches de *Pseudomonas* après stockage.

IV.3. Discussion

Le test de thermotolérance a montré que parmi les souches étudiées, six sont relativement résistantes et peuvent croître même à 45 °C. Le choix de ce critère, parmi d'autres, repose sur l'hypothèse qu'une souche ayant survécu dans un environnement drastique (chaud et sec) peut posséder ou développer des mécanismes d'adaptation à ce genre de stress. Or, en biotechnologie microbienne, lors des étapes de formulation et/ou au cours de leur stockage, les préparations à base de microorganismes enregistrent systématiquement des pertes en viabilité. C'est dans cette optique, que nous avons sélectionné des souches résistantes, qui peuvent tolérer des traitements ou des chocs thermiques.

Une sélection rigoureuse est le premier des facteurs pour l'amélioration de la conservation des *Pseudomonas* spp fluorescents, pour garantir une viabilité commercialement satisfaisante. Pour le stockage à long terme, il est opportun de sélectionner des souches qui ont survécu à des conditions drastiques (température élevée). Le criblage de microorganismes thermotolérants est souvent avancé comme un préalable, pour d'éventuelles utilisations comme des biopesticides ou des biofertilisants (Niamsup et al., 2003 ; Prasad et al., 2003).

Pour expliquer le phénomène de résistance thermique, que présentent ces souches en leur permettant de croître et de se reproduire à 45 °C, une analyse des acides gras cellulaires (AGC) a été réalisée. Six principaux acides gras ont été identifiés, à savoir les acides palmitique (C16:0), palmitoléique (C16:1), stéarique (C18:0), oléique (C18:1), linoléique (C18:2) et l'acide linoléique (C18:3). Les acides gras insaturés sont faiblement présents. Aux regards de ces résultats, la thermoresistance des souches sélectionnées est probablement attribuée, au moins en partie, à ces acides gras cellulaires. Les travaux de Sow et al., (2004), montrent que la thermotolérance bactérienne peut être la résultante de plusieurs facteurs, dont la synthèse d'un fort pourcentage d'acide oléique (C18:1) et dans une moindre mesure d'acide linoléique (C18:3). Russell *et al.*, (2002) et Yoo *et al.* (2005) sont unanimes sur ce sujet, en concluant que la diminution de la synthèse des acides gras monoinsaturés est étroitement liée à l'augmentation de la température d'incubation. Ceci constitue, en fait, une réponse à une modification de la fluidité membranaire.

Les acides gras saturés est un moyen pour réguler la fluidité des membranes biologiques en fonction de la température. Les lipides membranaires sont le siège d'intenses modifications en vue de maintenir une fluidité et ainsi d'en assurer la perméabilité des membranes cellulaires. Cette activité est indispensable pour le bon fonctionnement des cellules en cas de stress (Russell *et al.*, 1989). D'autres travaux effectués par Russell *et al.*, (1995) ont montré que l'augmentation de la synthèse des acides gras insaturés (C18:1 principalement) et de C16:0 régule la fluidité membranaire, qui était fortement liée à l'élévation de la température d'incubation des bactéries. Donc il est évident de conclure, que la résistance cellulaire et l'adaptation des bactéries aux conditions drastiques sont en fonction de la modification des phospholipides membranaires.

En se basant sur ces critères (thermorésistance et composition en AGC), nos résultats ont permis de trier trois souches bactériennes (BB9, BB10 et F21), pour des essais de formulation, sous forme de poudres séchées, par voie de lyophilisation. A cette finalité, la viabilité des cellules bactériennes est un préalable «sine qua none» pour envisager une procédure de formulation efficace et réussie lors de son application. Le processus de lyophilisation a engendré une nette diminution dans les taux de viabilité des trois souches, dans l'intervalle de 1,10% à 6,51%. Certes, de tels taux apparaissent relativement faibles ; néanmoins la quasi-totalité des travaux,

dans ce domaine, souligne cette faiblesse et ce niveau de viabilité reste suffisant pour des procédures de formulation. Stephan *et al.*, (2016) ont obtenu des niveaux variant entre 2% à 10%, avec cinq souches de *Pseudomonas* après lyophilisation sans optimisation.

Les résultats présentés ici apportent un support expérimental à l'hypothèse que la lyophilisation et le stockage endommagent les membranes des bactéries testées. Ainsi la perte de viabilité reste l'un des inconvénients majeurs lors de la lyophilisation des préparations bactériennes (Shafiei et al. 2013). La tolérance des microorganismes à la lyophilisation dépend du milieu utilisé, de l'état physiologique des cellules, du temps de congélation, des paramètres de lyophilisation, des conditions de réhydratation et de la concentration cellulaire initiale (Palmfeldt, 2003 ; Shafiei *et al.*, 2013; Sahu *et al.*, 2018).

Par rapport aux bactéries Gram positif, celles de Gram négatif démontrent généralement un taux de survie plus faible après lyophilisation (Mputu Kanyinda, 2014). Le taux de survie dépend du genre bactérien, ainsi il a été montré que le taux de survie, après congélation, est plus élevé avec les bactéries à Gram positif (*Brevibacterium* et *Corynebacterium*) que pour les bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas*), respectivement, de 80 % et de 50 %. De même, les spores, chez les bactéries sporales, sont plus résistantes à la lyophilisation que les cellules végétatives (Morgan et Vesey, 2009).

La survie bactérienne pendant la lyophilisation n'est pas seulement influencée par les caractéristiques intrinsèques de l'espèce bactérienne, mais également par d'autres facteurs extrinsèques : le milieu de suspension utilisé, le moment de la récolte, les conditions de croissance, les concentrations en cellules dans le milieu de fermentation, les conditions de lyophilisation et de réhydratation (Heckly, 1985 ; Bisutti *et al.*, 2015).

La lyophilisation est largement utilisée pour la conservation de diverses substances biologiques, même en engendrant des effets indésirables suite au processus de déshydratation. Etant donné que les molécules d'eau contribuent à la stabilisation des protéines, de l'ADN et des lipides en conférant l'ordre structural aux cellules ; ainsi l'élimination de l'eau (en particulier l'eau liée) affecte directement la viabilité (Santivarangkna *et al.*, 2008). Tous les sites cellulaires, tels que la paroi cellulaire, le chromosome, les ribosomes, les membranes et les enzymes (Shafiei *et al.*, 2013) sont soumis à des traitements physiques, notamment la congélation et le

séchage (Hurst, 1977; Shafiei et al., 2013). De tels traitements, exposent les cellules bactériennes aux contraintes de concentration élevée de solutés, y compris des pH extrêmes, à des basses températures, à la formation de cristaux de glace et à l'élimination d'eau des cellules bactériennes (Zhao and Zhang, 2005).

Les bactéries Gram – (*Pseudomonas chlororaphis* et *P. fluorescens...*etc.) sont très sensibles à toutes formes de séchage surtout en l'absence de composés protecteurs (Palmfeldt et al., 2003; Nanasombat et Sriwong, 2007). Ces bactéries ont tendance à une rupture plus grande pendant les processus de dessiccation et de réhydratation (Pembrey et al., 1999). Cette sensibilité est due à la composition de leur paroi cellulaire, présentant une couche mince en peptidoglycanes (environ 5 à 10 nm), par rapport à celle des Gram + (20 à 80 nm). L'absence de l'acide techoïque chez la bactérie Gram - réduit sa résistance au séchage par rapport à son homologue Gram + (Alberts et al., 1994; Beveridge, 1999 ; Lodish et al., 2000). La plupart des bactéries Gram-négatives ont des lipopolysaccharides sur leurs surfaces (Gupta, 2002). Les membranes cellulaires sont souvent endommagées pendant le processus de congélation, ou pendant la dessiccation et la réhydratation (Wolfe et Bryant, 1999).

Des changements de perméabilité ont conduit à suggérer que la lyophilisation, crée de petits pores dans la membrane cytoplasmique engendrant la fuite de matériel cytoplasmique (Wesche et al., 2009). Bien que la diminution de la teneur en eau pendant la lyophilisation entraîne certaines lésions cellulaires (Shafiei et al., 2013), cependant le reste de l'eau dans les cellules séchées favorise également les réactions défavorables (Lievense et van't Riet , 1994). Les compositions lipidiques des cellules lyophilisées changent habituellement en raison des réactions d'oxydation et une diminution du rapport entre la teneur en acides gras insaturés et saturés des cellules est observée (Castro et al., 1996; Coulibaly et al., 2009). Les lipides membranaires jouent un rôle important dans la perméabilité des membranes cytoplasmiques ; il est apparu probable que les dommages subis par les membranes lors de la lyophilisation et du stockage étaient dus à des modifications du profil lipidique (Teixeira et al., 1996). La formation de radicaux pendant les premiers jours de stockage peut être une preuve de l'instabilité des réactions d'oxydation des bactéries lyophilisées (Carlsen et al., 2009). A l'état sec, les biomolécules deviennent plus sensibles à l'attaque de l'oxygène (Garait et al., 2005), souvent due aux espèces

oxygénées réactives (ROS), qui peuvent endommager les protéines, modifier les bases et les sucres des acide désoxyribonucléique (ADN) (Blair, 2008).

Dans nos travaux, nous avons constaté que l'ajout de protecteurs (glycérol et maltodextrine), avant la lyophilisation, ne modifie pas significativement la viabilité bactérienne pendant la lyophilisation, mais ils influencent positivement la stabilité pendant le stockage. Les additifs ont un rôle important dans la conservation et le maintien de la viabilité cellulaire. Il est rapporté que la présence d'antioxydants augmente le taux de survie des bactéries séchées pendant le stockage (Carvalho et al., 2003; Coulibaly et al., 2009).

Pour remplir ces fonctions, l'additif utilisé comme protecteur devrait fournir une bonne cryoprotection des cellules pendant la lyophilisation, il doit être facile à sécher et fournir les atouts d'une matrice permettant la stabilité et la facilité de réhydratation (Costa et al., 2000). Stephan et al., (2016) ont démontré que la congélation sans agents cryoprotecteurs (CPA) affectait de façon spectaculaire la survie souches de *P. putida* et *P. fluerecsens*. Lorsque la souche *P. fluerecsens* Pf153 a été mise en suspension dans du saccharose, du lactose, de l'acide ligninosulfonique, du glucose ou du lait écrémé, la viabilité a augmentait à deux décimales par rapport aux cellules sans protection. Palmfeldt et al., (2003) ont montré qu'une combinaison de plusieurs CPA augmente la viabilité des cellules après leur lyophilisation. Les CPAs ont deux fonctions principales : protègent les cellules vivantes, biochimiquement, contre les dommages lors de la congélation et fournissent un résidu sec avec une structure physique définie, agissant comme matériau de support et comme récepteur lors de la réhydratation (Berny et Hennebert 1991). 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). L'addition de composés protecteurs, lors des opérations de séchage de suspensions de souches de *Pseudomonas*, améliore nettement les niveaux de leur viabilité (Palmfeldt et al., 2003; Stephan et al., 2007

La lyophilisation entraîne des effets secondaires indésirables, tels que des modifications de l'état physique des lipides membranaires (Shafiei et al., 2013). Selon la théorie de Crowe et al.,(1987), l'élimination de l'eau liée à l'hydrogène de la bicouche de phospholipides entraîne une augmentation de l'empaquetage dans le groupe de tête des lipides membranaires (Shafiei et al., 2013) et l'altération des protéines, entraînant la perte de viabilité cellulaire pendant le processus ainsi que

pendant le stockage ultérieur (Garait *et al.*, 2005; Nanasombat et Sriwong, 2007). L'oxydation lipidique des cellules membranaires a été jugée responsable de la mort cellulaire pendant la lyophilisation et pendant le stockage (Teixeira *et al.*, 1996; Mputu Kanyinda *et al.*, 2012).

Plusieurs approches décrites optimisent la formulation d'un agent de lutte biologique, comme l'application de matériaux porteurs appropriés (Vidhyasekaran *et al.*, 1997; Krishramuthy et Grarananickam 1998; Ali *et al.*, 2001) et des additifs de formulation. Ces derniers devraient améliorer l'efficacité de l'antagoniste en matière de lutte biologique, mais ne devraient pas favoriser la croissance de l'agent pathogène ni causer de dommages à la plante hôte (Wiyono *et al.* 2008 ; Sallam *et al.*, 2013).

Bien que divers types de formulations de *Pseudomonas* aient été développés par plusieurs auteurs (Dandurand *et al.*, 1994 ; Moenne-Loccoz *et al.*, 1999 ; Commare *et al.*, 2002; Rajappan *et al.*, 2002; Senthil *et al.*, 2003 ; Bora *et al.*, 2004 ; Mathivanan *et al.*, 2006), le stockage et le développement de produits commerciaux restent toujours limités, à cause de certaines contraintes (Stephan *et al.*, 2016). (i) L'effet protecteur est parfois insuffisant par rapport aux produits chimiques (Shishkoff et McGrath, 2002) ou n'est pas constant, dépendant notamment des conditions du milieu (température, sol, humidité, plante hôte, pH, etc...) (Mendoza Garcia *et al.*, 2003). (ii) Le coût et le délai sont très élevés pour l'enregistrement technique, de même que le coût de production reste très élevé pour la plupart des agents de biocontrôle, relativement aux formulations chimiques (Fravel *et al.* 1999). (iii) Le conditionnement et la formulation sont très difficiles pour des espèces non sporulantes et même parfois pour les espèces sporulantes (Hjeljord *et al.* 2000; Collins et Jacobsen 2003).

Dans un aspect comparatif, les pesticides chimiques peuvent offrir rapidement une activité beaucoup plus efficace, tandis que les biopesticides peuvent avoir besoin de temps après leur application pour commencer à agir. Il est important de se rappeler que la plupart des biopesticides sont composés d'organismes vivants qui ont un spectre relativement restreint de ravageurs cibles (Akram, 2008).

La viabilité des inoculats peut en souffrir à différents stades avant et pendant l'application. Tout d'abord, un produit acceptable doit afficher une durée de conservation suffisamment longue, décrivant la stabilité tout au long du processus de

production, du conditionnement, du stockage et des conditions de transport (Arora et al., 2011).

Lors de l'application ultérieure sur le terrain, l'inoculat microbien est confronté à des facteurs supplémentaires préjudiciables à sa viabilité. Ceux-ci incluent les rayons UV (Zohar-Perez et al., 2003), en particulier lorsqu'ils sont appliqués sur des parties de plantes hors sol, les propriétés fluctuantes du sol telles que la texture, la température et le pH (Arora et al., 2011), ainsi que des cycles de séchage et de mouillage répétés selon les conditions climatiques et la fréquence des précipitations. Pour les inoculats appliqués directement sur les semences, la toxicité inhérente de l'enveloppe de la graine peut être nocive (Deaker et al., 2012).

De plus, les interactions biotiques avec la microflore et la microfaune indigènes représentent un défi majeur pour toutes les souches appliquées. Fréquemment, le nombre de cellules d'une souche introduite diminue après l'application sur un sol non stérile, car il est neutralisé par les microbes indigènes ou diminué par les prédateurs, tels que les protozoaires (Bashan, 1998; Arora et al., 2011). De toute évidence, les facteurs de stress pré-application survenant au cours du processus de production exacerbent ce problème : plus le nombre de cellules viables livrées sur le terrain est faible, moins la réussite de l'établissement sur le site cible est probable. Un processus de formulation adéquat est donc d'une importance vitale (Berninger et al., 2017).

Chapitre V : Biocontrôle de la fusariose vasculaire de la tomate

Chapitre V : Biocontrôle de la fusariose vasculaire de la tomate

V.1. Introduction

Les pratiques agricoles adoptées, depuis les dernières décennies du siècle passé, ne cessent de faire l'usage systématique des intrants chimiques que ce soit pour améliorer les fertilités des sols, augmenter et varier les rendements, aussi pour protéger les cultures et les produits agricoles jusqu'à leur utilisation directe, leur stockage et même durant leur transformation agroalimentaire. Ainsi, avec les tendances alarmistes sur les conséquences de ces produits chimiques sur la santé des consommateurs, sur la pollution environnementale, particulièrement la pollution des sols et de l'eau, les orientations actuelles et celles d'un proche futur, à court terme, sont unanimes pour le développement d'autres alternatives qui prônent la diminution à grande échelle, voir même l'interdiction de l'usage des produits chimiques, dans certaines situations. De nombreuses études et expérimentations, même des applications en conditions réelles, ont mis en évidence l'importance et l'opportunité de l'utilisation d'alternatives biologiques à base de microorganismes, que ce soit à titre de biofertilisants ou de biopesticides (Lemanceau et *al.*, 2012; Le Mire et *al.*, 2016 ; Prabhukarthikeyan et *al.*, 2018; Karakurt et Aslantas, 2010; Calvo et *al.*, 2014; Tabassum et *al.*, 2017; Novo et *al.*, 2018). Depuis quelques décennies, certains types de rhizobactéries « PGPR, plant growth promoting rhizobacteria » sont présentés comme des agents potentiellement phytobénéfiques, assurant à la fois la phytostimulation de la croissance végétale (Kloepper et *al.*, 1980 ; Silva et *al.*, 2006 ; Benchabane et *al.*, 2013 ; Sivasakthi et *al.*, 2014 ; Novo et *al.*, 2018), la bioprotection des plantes vis-à-vis de nombreuses pathologies végétales (Ongena et *al.*, 2005; Figueroa-Lopez et *al.*, 2017) et l'induction et le renforcement des capacités défensives et de résistance chez les plantes (Ramette et *al.*, 2003; Lemanceau et *al.*, 2014).

Parmi ces PGPRs, le groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents est considéré comme un pôle de recherche et de développement de formulations microbiennes, dont l'intérêt ne cesse d'augmenter, qui est démontré avec l'engouement et la grande masse des travaux de recherche et de publications qui lui sont dédiés. Les PGPRs sont des microorganismes bien adaptés à la vie tellurique, particulièrement dans les espaces rhizosphériques où ils sont capables de délivrer diverses

métabolites secondaires, profitables aux plantes directement, en améliorant leur balance nutritionnelle, et/ou indirectement en éliminant ou en inhibant les microflores parasites phytopathogènes (Walsh et al., 2001; Haas et Defago, 2005; Weller, 2007; Ahmad et al., Benchabane et al., 2013; Upadhyay et al., 2016; Figueroa-Lopez et al., 2017; Novo et al., 2018).

Les souches de *Pseudomonas*, cependant, n'ont pas été largement commercialisées, en raison de la non disponibilité de formulations viables longtemps et facilement stockables. Il est utile de rappeler que parmi les produits biologiques commercialisés dans le monde, pour lutter contre les maladies et favoriser la croissance des plantes, seuls 6% étaient conçus avec des *Pseudomonas*, contre 15% pour *Bacillus* et encore plus pour *Trichoderma* (Bettiol et al., 2012 ; Corrêa et al., 2015). Une telle faiblesse sur le marché est attribuée, en grande partie, au manque de formulations adaptées aux pratiques agricoles, mais aussi au manque de garanties de reproductibilité des résultats de la recherche expérimentale sur terrain.

Dans ce contexte, notre laboratoire a œuvré dans des thématiques de recherche depuis plusieurs années, à travers de nombreuses expérimentations, aboutissant à sélectionner quelques souches rhizobactériennes efficaces dans la phytostimulation et le biocontrôle de diverses maladies des plantes, notamment les fusarioses vasculaires. Dans notre présent travail, après avoir appliqué des méthodologies expérimentales, retraçant l'isolement, la sélection et le criblage de souches potentiellement phytobénéfiques (cf. chapitres II), nous avons retenu celles synthétisant les métabolites secondaires d'intérêt (cf. chapitres III).

Il est à souligné que ces souches sont expérimentées presque annuellement, depuis au moins dix années dans divers essais, en procédant avec des inoculats préparés extemporanément, ou enrobés avec des matériaux à usage de court terme (quelques jours) (Benchabane et al., 2012, Berdja, 2012 ; Boukarma, 2012 ; Toua et al., 2013 ; Mekhaldi, 2016 ; Yala, 2016).

La tomate se présente parmi les cultures modèles, les plus expérimentées par rapport à ses réponses quantifiables en biostimulation (Steinkellner et al., 2007; Nefzi et al., 2018) et dans sa bioprotection vis-à-vis de la fusariose vasculaire (Lemanceau, 1992 ; McGovern, 2015 ; Sun et al., 2017, Sathiyabama et Charles, 2015 ; Sharma et al., 2018).

Notre objectif, avec l'aboutissement de la conception de formulations lyophilisées de trois souches (cf. chapitre IV), est de concrétiser leur application. A

ce titre, nous voulons, à travers ce chapitre, vérifier la viabilité des formulations rhizobactériennes conçues et mettre en épreuve leur efficacité *in vitro* et *in situ*.

V.2. Matériel et méthodes

V.2.1. Agent phytopathogène

L'Agent pathogène *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL, MUCL 43876) fourni par la Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain, Belgique a été utilisé pour les essais de biocontrôle de la fusariose vasculaire de la tomate. La suspension fongique a été préparée en cultivant FOL sur PDA (Potato Dextrose Agar) et incubée à 25 °C pendant 7 jours. Le mycélium a été raclé et remis en suspension dans un milieu nutritif liquide et cultivé à 25 °C. La suspension finale a été étalonnée avec du MgSO₄ 10 mM stérile à une concentration de 10⁶ conidies/ml. La pureté a été vérifiée avec des cultures monospores sur PDA. Les suspensions conidiennes ont été préparées avec des disques de culture fongiques (âgées de huit jours, incubées à 28 °C) et inondées avec 2 ml d'eau distillée stérile. La culture est ainsi raclée et mise en suspension dans 48 ml d'eau distillée stérile. Les suspensions de macroconidies obtenues ont été filtrées à travers six couches de gazes stériles, pour séparer le mycélium des conidies, et ajustées par un hématimètre à 10⁶ microconidies / ml (Benchabane, 2005).]

V.2.2. Inoculats bactériennes

Trois souches (BB9, BB10 et F21) (Tableau V.1), de *Pseudomonas fluorescens*, précédemment sélectionnées et lyophilisées (cf. chapitres III et IV) avec des cryoprotecteurs (Maltodextrine plus glycerol) ou lyophilisées sans additifs protecteurs ont été utilisées dans nos essais de biocontrôle vasculaire de la fusariose. Les lyophilisats obtenus ont été scellés sous vide (Figure IV.1.A), dans des sachets en aluminium (250 g) et stockés pendant cinq années à 4 °C.

Tableau V.1 : Origine des souches sélectionnées.

Souches	Origine de l'isolement	Observation
F21	Rhizosphère du palmier dattier	Sid +, HCN+, IAA +, phos +, phz+, Lip-, Amy+, Chit+, Cel-, Pec-, Prot+ ,Amm+
BB9	Rhizosphère du palmier dattier	Sid +, HCN+, IAA -, phos +, phz + Lip-, Amy+, Chit+, Cel-, Pec-, Prot+ ,Amm+
BB10	Rhizosphère du palmier dattier	Sid +, HCN+, IAA +, phos +, phz - Lip-, Amy+, Chit+, Cel-, Pec-, Prot- ,Amm+

Sid :Siderophore; HCN: Acide cyanidrique ; AIA : Acide Indole Acétique ; Phos : Phosphatase Prot : Protease ; Phz: Phenazine Chit :Chitinase ; Cel :Cellulase ; Pec :Pectinase ;Lip :lipase ;Amy :Amylase ; Ammo :Ammoniac (+) :reaction positif ;(-) :réaction négative.

1g de chaque lyophilisat (Figure IV.B) de *Pseudomonas* a été réhydraté dans un tube à essai contient 9ml d'eau distillée stérile puis ensemencées sur le milieu King B (Annexe I). Les souches bactériennes non lyophilisées ont été repiquées sur boites de Pétri contenant le même milieu (Figure V.1 C).



A et B : souches de *Pseudomonas* lyophilisées sous forme de poudre conservés dans des sacs opaque sous vide, **C** : souches bactériennes non lyophilisées purifiées.

Figure V.1 : Réhydratation et purification de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisées.

V.2.3. Matériel végétal

La variété « var. marmande) de la tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) a été utilisé dans nos essais *in situ*. Les semences sont fournies par l'Institut Technique des Cultures Maraichères et Industrielles, ITCMI - Staouali, Alger).

La désinfection des graines de tomate a été réalisée dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2%, par immersion pendant 3 minutes, suivie de trois rinçages à l'eau distillée stérile durant 2 minutes pour chaque rinçage. En conditions d'asepsie, ces graines ont été mises dans des boîtes Pétri en verre stériles, tapissées de papier filtre stérile imbibé d'eau. Les boites recouvertes avec du papier

aluminium sont étuvées (23°C) pendant 4 à 7 jours, jusqu'à au début de la prégermination des graines, qui sont directement transférées à ce stade dans des alvéoles contenant de la tourbe stérile pour l'obtention de plantules de tomate.

V.2.4. Sol

Le sol est prélevé au niveau la station expérimentale du département de biotechnologie (Faculté SNV, Université de Blida 1) à partir de parcelles de terrain, non cultivée depuis au moins deux décennies. Les caractéristiques physicochimiques du sol ont été étudiées au niveau du laboratoire de pédologie (Boukerma, 2012) (pH = 6,7, K 0.63 %, Na 2,63 %, capacité d'échange cationique 12,5 meq /100 g de sol, phosphore assimilable 189,33 ppm, teneur en matière organique 1,89%). Le sol a été séché à l'air libre et débarrassé de ses éléments grossiers avant qu'il soit tamisé (2 mm). Des opérations de désinfection ont été réalisées par autoclavage (trois autoclavages de 30 minutes à 120°C et à 24 heures d'intervalle) pour inhiber la microflore indigène naturelle. Le sol désinfecté a été ajouté à la tourbe stérilisée (2: 1). Le substrat résultant a été utilisé pour remplir les alvéoles et les pots en plastique (200 g de substrat / pot).

V.2.5. Antagonisme *in vitro*

Le test d'antagonisme *in vitro* a été effectué avec les trois souches bactériennes de *Pseudomonas.spp* fluorescents lyophilisées ou non lyophilisées (cultures fraîches) vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici* agent de la fusariose vasculaire de la tomate par la méthode de la confrontation directe en boîte de Pétrie. Le pouvoir antagoniste a été testé sur trois milieux différents : le milieu PDA (favorable au développement des champignons), milieu KB (favorable au *Pseudomonas*) et le milieu mixte composé de parts égale des deux milieux.

Les interactions rhizobactéries -champignon sont réalisées selon les techniques décrites par Reddy & Patrick (Keel et *al.*, 1992). L'essai consiste à mettre au centre d'une boîte de Petri un disque gélosé de l'agent pathogène (Fol) (5mm de diamètre) d'une culture de 7 jours sur milieu PDA (Annexe I) et quatre disques de papier filtre (5mm de diamètre) stériles imbibés de crème bactérienne d'une culture de 24h sur milieu KB dans la périphérie à une distance de 2,8 cm du centre de la boîte de Petri. Après 7 jours d'incubation à 25°C, les mensurations des diamètres de la croissance de Fol ont été effectuées afin d'évaluer les effets d'inhibition. 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)

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

R témoin : Distance radiale maximale de la croissance du champignon. **R** test : Distance radiale sur une ligne en direction de l'antagoniste.

V.2.6. Antagonisme in situ

L'étude a inclue les trois souches bactériennes lyophilisées (BB9, BB10, F21), vis à vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* G2, agent de la fusariose vasculaire de tomate

V.2.6.1 Test de pathogénicité

Avant la réalisation de test d'antagonisme *in situ*, un test de virulence du champignon G2 a été vérifié par inoculation de plantules de tomate. Deux semaines après le semis, cinq ou dix jeunes plantes de tomate (stade apparition de la première feuille vraie) sont déterrées ; leurs racines sont lavées à l'eau du robinet, puis mises à tremper pendant 15 min dans une suspension de microconidies titrant 10^6 spores/ml. Les microconidies proviennent d'une culture de la souche à inoculer âgée de 4 jours obtenue par étalement uniforme à la surface du milieu en boîte de Pétri d'une suspension dense de microconidies. Les témoins sont trempés dans l'eau pendant le même temps. Plantules inoculées ou témoins sont ensuite repiqués dans des godets de 5 cm de diamètre, contenant du terreau. Selon les essais, cinq ou dix plantes de chaque variété sont utilisées pour chaque souche à inoculer (Boisson et Geig, 1994).

V.2.6.2. Désinfection des semences

La désinfection des graines de tomate a été réalisée dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2%. Elles y ont immergé pendant 10 minutes à température ambiante, suivi de trois rinçages à l'eau distillée stérile durant 20 minutes pour chaque rinçage) (Messiaen *et al.*, 1991 ; Boukerma *et al.*, 2017). Dans

des conditions d'asepsie, ces graines ont été mises dans des boîtes de Pétri en verre stériles, tapissées de papier filtre stérile imbibé d'eau. Les boîtes ont été recouvertes avec du papier aluminium pour les abriter de la lumière et incubées à une température de 23°C dans l'étuve pendant 4 jours (fig.13 C) (Boukerma et *al.*, 2017). Après 7 jours les graines prégermées ont été transférées dans des alvéoles à raison de deux graines par alvéole avec un arrosage quotidien.

V.2.6.3. Conditions d'expérimentation

. Les essais ont été réalisés au niveau de la station expérimentale du département de biotechnologie de l'université de Blida 1, sous serre en polycarbonate, aérée par des fenêtres latérales et chauffée par des radiateurs sous un cycle jour / nuit de 16/8 h, 28 ° C / 18 ° C. C ± 2 ° C et 60 à 65% d'humidité relative.

V.2.6.4. Préparation d'inoculum

Pour la préparation des suspensions bactériennes des trois souches antagonistes, nous avons utilisé des cultures bactériennes âgées de 24 h cultivé sur le milieu KB et incubé à 23°C. A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, la crème bactérienne a été raclée puis transférée dans un flacon contenant de l'eau distillé stérile. Les suspensions bactériennes ont été ajustées à une concentration de 10^7 UFC/ml (de longueur d'onde $\lambda = 620$ nm) (Benchabane, 2005). Pour la préparation de l'inoculum fongique, le champignon a été repiqué sur milieu PDA et incubé à 25°C pendant 7 jours. Une suspension conidiennne a été préparée après repiquage des 6 disques mycéliens ensemencée sur milieu PDB. Les cultures ont été incubées sous agitation 170 tour/min et filtrées par les compresses stériles pour assurer un filtrat des conidies seulement. La concentration des suspensions conidiennes a été ajustée, à l'aide d'un hématimètre à 10^7 conidies /ml (Benchabane, 2005).

V.2.6.5. Bactérisation et inoculation fongique des plantes

➤ Bactérisation

Au stade 2 à 3 feuilles, chaque alvéole, contenant un plant de tomate, a reçu 5 mL d'une suspension bactérienne de 10^7 à 10^8 cfu ml⁻¹ aux alentours des racines déterrées (Benchabane et *al.*,2000) .



Figure V.2. : Inoculations bactériennes.

Après 24 h de l'inoculation bactérienne, les plantules ont été transplantées dans des pots en plastiques de 9.5 cm de hauteur et de 4.5 cm de diamètre (200 g de substrat / pot) (Figure V.3). L'arrosage des plantules a été effectué chaque jour avec de l'eau stérile.

➤ Inoculation fongique

Après 48 h de l'inoculation par les solutions bactériennes, les plantules ont été inoculées par le champignon Fol. Les plantes des témoins négatives ont été inoculées par l'eau distillée stérile. Les plantes des témoins positives ont été inoculées uniquement avec la suspension conidiennne de Fol. L'inoculation fongique a été effectuée par injection des racines par la suspension conidiennne à raison de 2 ml par pot (Benchabane, 2005).

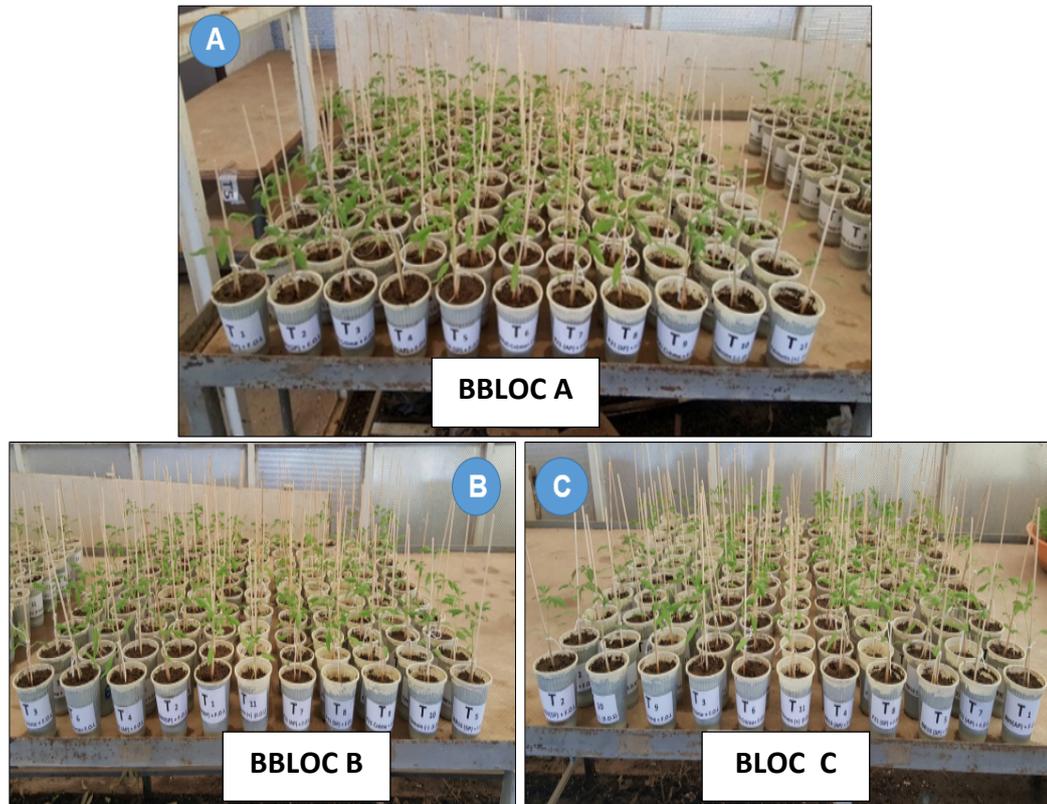
V.2.6.6. Dispositif expérimental

Nous avons adopté un dispositif expérimental en trois blocs aléatoires complets sous serre en verre. Chaque bloc est composé de onze traitements. Chaque traitement est représenté par dix plants par bloc, soit 30 plants par traitement. Le nombre total des plantes était de 330 pour chaque variété de tomate (Saint pierre et Marmande). Le dispositif expérimental établi est présenté par la figure ci-dessous.

Les traitements utilisés sont les suivants :

- **T1, T4 et T7** : plants inoculées respectivement avec les souches **BB9, BB10, F21 lyophilisées avec cryoprotecteur** en interaction avec **F.O.L.**
- **T2, T5 et T8** : plants inoculées respectivement avec les souches **BB9, BB10, F21 lyophilisées sans cryoprotecteur** en interaction avec **F.O.L.**

- **T3, T6 et T9** : plants inoculés respectivement avec les souches **BB9, BB10, F21** non lyophilisées (à l'état fraîche) en interaction avec **F.O.L.**
- **T10** : **Témoin positif (+)**, plants inoculés uniquement avec la suspension conidienne de **F.O.L.**
- **T11** : **Témoin négatif (-)**, plants inoculés uniquement par l'eau distillée stérile.



Répartition des traitements au niveau de chaque bloc

A : Bloc 1 : T1 T2 T3 T4 T5 T6 T7 T8 T9 T- T+.

B : Bloc 2 : T3 T6 T4 T2 T1 T+ T7 T8 T9 T- T5.

C : Bloc 3 : T2 T- T9 T3 T6 T+ T4 T8 T5 T7 T1.

Figure V.3 : Dispositif expérimental (3 bloc aléatoire complets)

V.2.6.7. Suivi du développement de la maladie

Un suivi quotidien des symptômes a commencé 24 h après l'application de la suspension fongique pendant une période de 60 jours. La notation des symptômes typiques de la fusariose vasculaire a été réalisée individuellement sur chaque plant pour évaluer les paramètres de la maladie selon des formules définies (Boukerma *et al.*, 2017).

L'estimation de la progression de la maladie, a été réalisé à l'aide d'une échelle adaptée (Figure V.4), pour le flétrissement de *Fusarium* des plantes herbacées telles que définies par Benchabane *et al.*, (2000) et Boukerma, (2012).

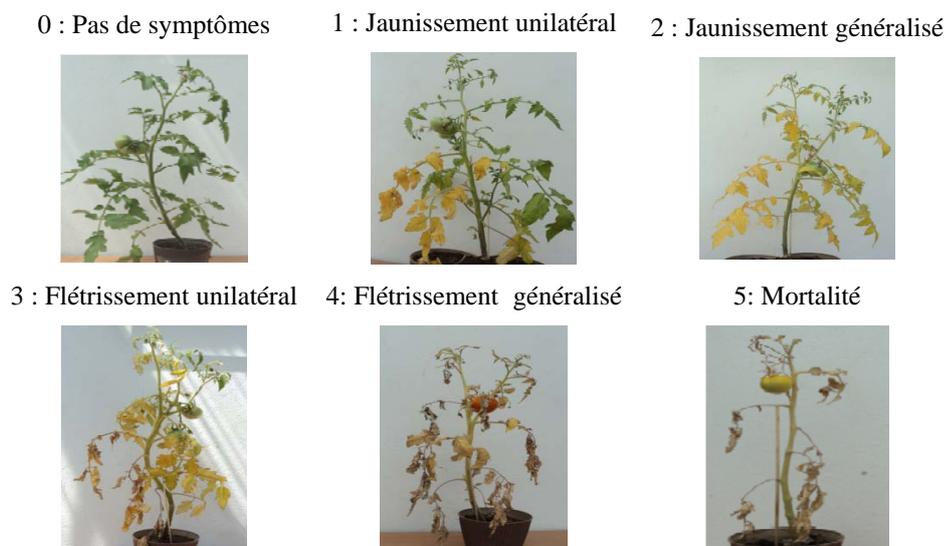


Figure V.4 : Echelle d'évaluation des symptômes typiques de la fusariose vasculaire de la tomate

1- Taux d'infection

Ce taux exprime le pourcentage des plants malades, relatif au nombre total des plants (N) examinés et le nombre des plants malades (n) (Manikandan et *al.*, 2010).

$$\text{Taux d'infection (\%)} \square \left(\frac{\sum n}{N} \right) \times 100$$

n : Nombre des plants malades

N : Nombre total des plants observés

2- Indice de McKinney (Sévérité)

La sévérité de la fusariose vasculaire a été évaluée par le calcul de l'indice de McKinney (McKinney et *al.*, 1923).

$$\text{Indice de McKinney (\%)} \square \left[\frac{\sum (f.v)}{N.X} \right] \times 100$$

f : Echelle de l'infection.

v : nombre des plants par chaque classe.

N : nombre totale des plants observés.

X : valeur la plus élevée de l'échelle d'évaluation (5).

3-Taux d'inhibition (bioprotection)

Le niveau de protection des plants, vis-à-vis de la maladie, est exprimé en termes de taux d'inhibition de l'indice d'infection (I) et de la sévérité (S) par rapport aux témoins malades (T+).

V.2.6.7. Observation des coupes longitudinale

Pour confirmer la présence de l'agent pathogène au niveau des tissus vasculaire, des coupes réalisées au niveau des racines, collets, tiges inférieures, et des tiges supérieures des plants infectés par *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* permettent d'observer les symptômes internes aux niveaux des vaisseaux sous microscope photonique au grossissement (G : × 40) aussi que sous une loupe binoculaire.

V.2.6.8 Colonisation rhizosphérique

Dans le but d'évaluer le pouvoir colonisateur des souches bactériennes de *Pseudomonas*, une vérification de l'installation des bactéries au niveau des rhizosphères des plantes étudiées a été réalisée. A cet effet un fragment de racine est prélevé au niveau de chaque traitement et de chaque bloc, suivi de plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile et séché séparément sur papier filtre stérile. Chaque fragment a été déposé aseptiquement sur le milieu King B dans des boîtes de Pétri. Les observations ont été effectuées 24h à 48h après incubation à 25°C (Boukerma, 2012).

V.2.9. Paramètres de croissance

V.2.9.1. Hauteur de la tige

La hauteur des tiges a été mesurée à l'aide d'un mètre à ruban à partir de collet jusqu'à l'apex de la tige principale. A partir des mesures de la hauteur des tiges, effectuées chaque 10 jours pendant 1 mois, nous avons calculé la moyenne de chaque traitement, à travers les répétitions des blocs.

V.2.9.2 Poids frais et poids secs des parties aériennes

Tout plant choisi pour subir les mensurations, est coupé au niveau de collet et pesé immédiatement pour éviter les pertes dues à la déshydratation. Une fois le poids frais est noté, le plant est coupé en fragments et déposé dans l'étuve à 100 °C pendant 24 h pour déterminer son poids sec (Boukerma, 2012).

V.2.9.3. Poids frais et poids secs des parties souterraines

Après dépotage, les racines sont écartées soigneusement, lavées et secouées pour éliminer le substrat qui adhère et pesées pour déterminer le poids frais. Le poids sec a été déterminé de la même façon que les parties aériennes (Boukerma, 2012).

V.2.9.4. Chlorophylle totale

Pour la quantification de la chlorophylle, les échantillons de feuilles recueillies deux semaines après l'inoculation des agents pathogènes (5 feuilles, 3 répétitions pour chaque traitement). L'analyse a été effectuée selon la méthodologie décrite par Arnon (1949) : on mélange 0,5 g de poudre de feuilles avec 5 ml d'acétone (80%), après centrifugation à 4 000 tr / min pendant 5 min, les extraits ont été filtrés et l'absorbance a été mesurée à 649 et 665 nm de longueur d'onde (Kanawapee *et al.*, 2012).

Chlorophylle a (mg/g*MF) = $[12.21 \times A(665) - 2.79 \times (A(649))] \times V / (1000 \times W)$.

Chlorophylle b (mg/g*MF) = $[12.21 \times A(649) - 5.1 \times (A(665))] \times V / (1000 \times W)$.

Chlorophylle totale (mg/g*MF) = Chl a + Chl b.

A : absorbance.

V : volume de la solution extraite.

W : masse de la matière fraîche.

V.2.10. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de logiciel SYS STAT (version 13). Tous les paramètres analysés ont fait l'objet d'une analyse de variance (ANOVA) et sont comparés par le test de Newman-Keuls au seuil de probabilité ($\alpha = 0,05$) (Dagneli, 1975).

V.3 Résultats

V.3.1. Antagonisme *in vitro*

Globalement, les niveaux d'inhibition sont différenciés par rapport à l'état de la culture bactérienne (lyophilisée ou fraîche). En effet les lyophilisats semblent plus performants dans les trois milieux de cultures. La comparaison des valeurs moyennes des taux d'inhibition (Test Newman-Keuls, $\alpha = 5 \%$), après la mise en

évidence de variances significatives, fait apparaître huit groupes homogènes, dénotant ainsi une variabilité conséquentes, selon les interactions et les milieux de culture. Les taux d'inhibition les plus élevés ont été notés sur le milieu KB, par rapport aux deux autres milieux. (Tableau V.2).

Tableau V.2 : Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne

Souches bactériennes	Milieux de culture					
	PDA		KB		Mixte (PDA-KB)	
	lyophilisé	Non lyophilisé	lyophilisé	Non lyophilisé	lyophilisé	Non lyophilisé
F21	32,00 e (± 1,29)*	32,04 e (± 0,26)	54,16 a (± 1,89)	32,46 e (± 0,65)	25,83 f (± 1,90)	34,20 e (± 0,36)
BB10	43,50 c (± 0,90)	20,08 g (± 0,32)	48,34 b (± 1,88)	39,04 d (± 0,40)	22,08 g (± 0,72)	22,36 g (± 0,36)
BB9	26,58 f (±0,80)	10,25 i (± 0,55)	44,58 c (± 1,44)	41,90 c (± 0,81)	23,33 g (± 0,72)	17,10 h (± 0,51)

* : Ecart type issue de trois répétitions. Les valeurs ayant des lettres différentes ont des différences significatives (Test Newman-Keuls, $\alpha = 5\%$).

V.3.2. Test de pathogénicité

Les tests d'inoculation préliminaire ont permis de constater, après une semaine de leur inoculation, que les plants de tomate ont développé des symptômes relativement typiques aux symptômes externes de la fusariose vasculaire. Il s'agit du jaunissement généralisé et l'apparition de flétrissement. Une fois les plants sont déterrés, les racines apparaissent noircies et nécrosées et atrophiés. Donc, l'isolat fongique garde son pouvoir pathogène et sa virulence.

V.3.3. Biocontrôle de la fusariose vasculaire de la tomate

V.3.3.1. Evaluation de la maladie

Le suivi de développement de la maladie a révélé, que les premiers symptômes, annonceurs de situations de stress chez les plantules de tomate, sont apparus après 15 jours des opérations d'inoculation et de bactérisation. Le jaunissement a affecté, de manière intense les feuilles basales et celles du centre, de plus de la moitié des plants. Après une semaine (J22), l'évolution des symptômes est relativement rapide et même brutale, où le jaunissement s'est généralisé, provoquant des situations de flétrissement partiel et parfois total, notamment chez le témoin (Figure V.5).

Les plants bactérisés avec les souches BB9 (fraiche) et F21 (fraiche) ont montré des jaunissements affectant de grandes proportions des feuillages (Figure V.5 A et C). De même en présence de la souche F21 (lyophilisée sans protecteur), les taux d'infection sont relativement élevés, mais avec des indices échelles symptomatologiques qui ne dépassent pas le troisième niveau.

Le suivi du développement de la maladie de la fusariose vasculaire a été mentionné chaque jour, en se basant sur le descriptif symptomatologique typique de la maladie (figure V.6).

Le jaunissement unilatéral est observé au niveau des folioles, des feuilles du plant entier et enfin un jaunissement généralisé, les parties jaunies finissent par flétrir. Chez les plants bactérisés, le jaunissement et le flétrissement ne parviennent qu'aux premiers étages foliaires selon les traitements (figure V 7 A), contrairement aux témoins positifs où ces symptômes sont plus développés (figure V.7 B.).

Nous avons observé une décoloration longitudinale de la tige et un brunissement correspondant à une dégradation de vaisseaux vasculaires, qui sont plus accentués chez les témoins positifs par rapport aux plants bactérisés. De même, chez les plants malades, un brunissement à un noircissement des racines sont constatés chez certains plants accompagnés d'une dégradation de quelques chevelus racinaires (figure.V.8).

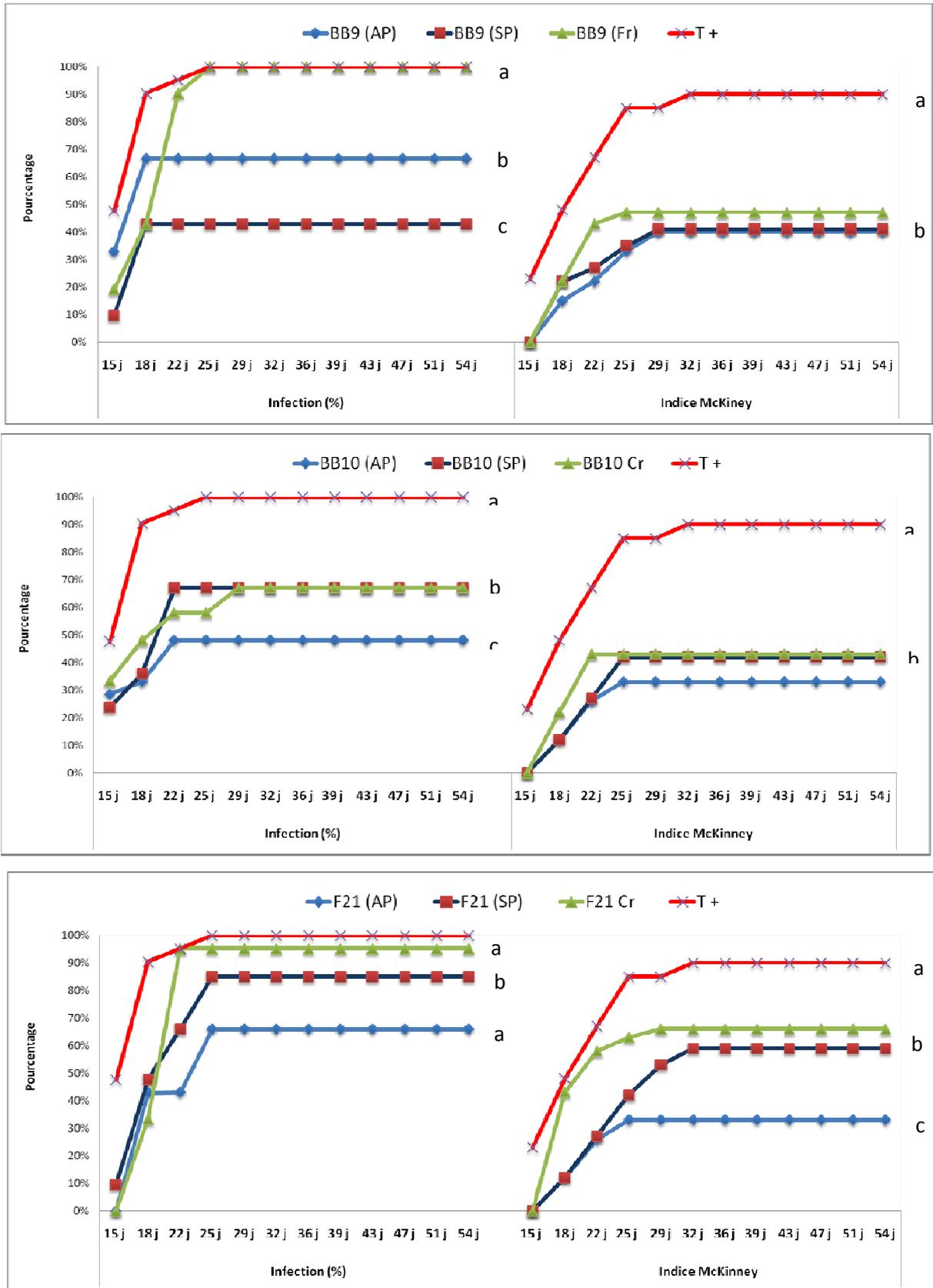


Figure V.5 : Evolution de la fusariose vasculaire (Infection et sévérité (Indice McKinney), en situation de biocontrôle avec les souches BB9 (A), BB10 (B) et F21 (C). (AP) Lyophilisat avec protecteur, (SP) Lyophilisat sans protecteur, Cr (Crème fraîche), (T+) Témoin positif sans bactérisation inoculé par le pathogène.

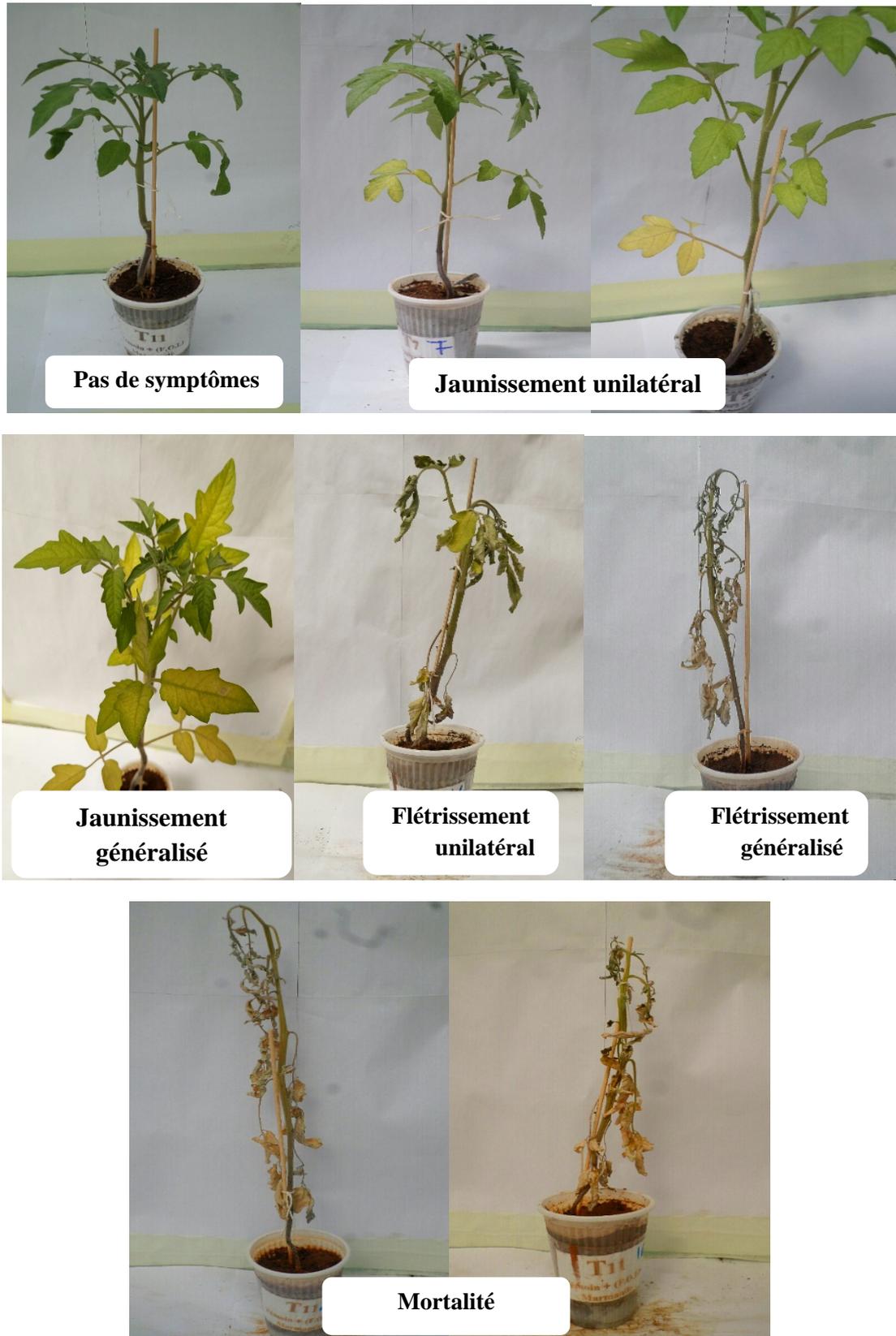


Figure V.6 : l'échelle de symptomatologie de la fusariose vasculaire de la tomate



A : Jaunissement des premiers étages foliaires chez les plants bactériés par la souche BB10 sans protecteur
B : jaunissement généralisé chez le témoin malade

Figure V.7 : Symptôme de la fusariose vasculaire chez les plants de tomates

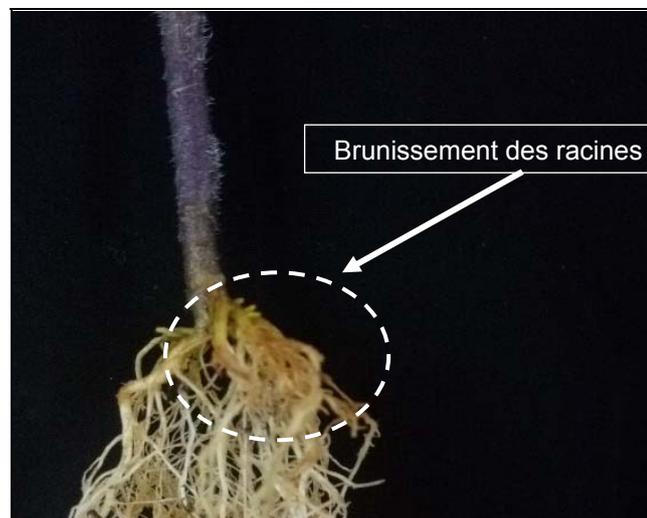
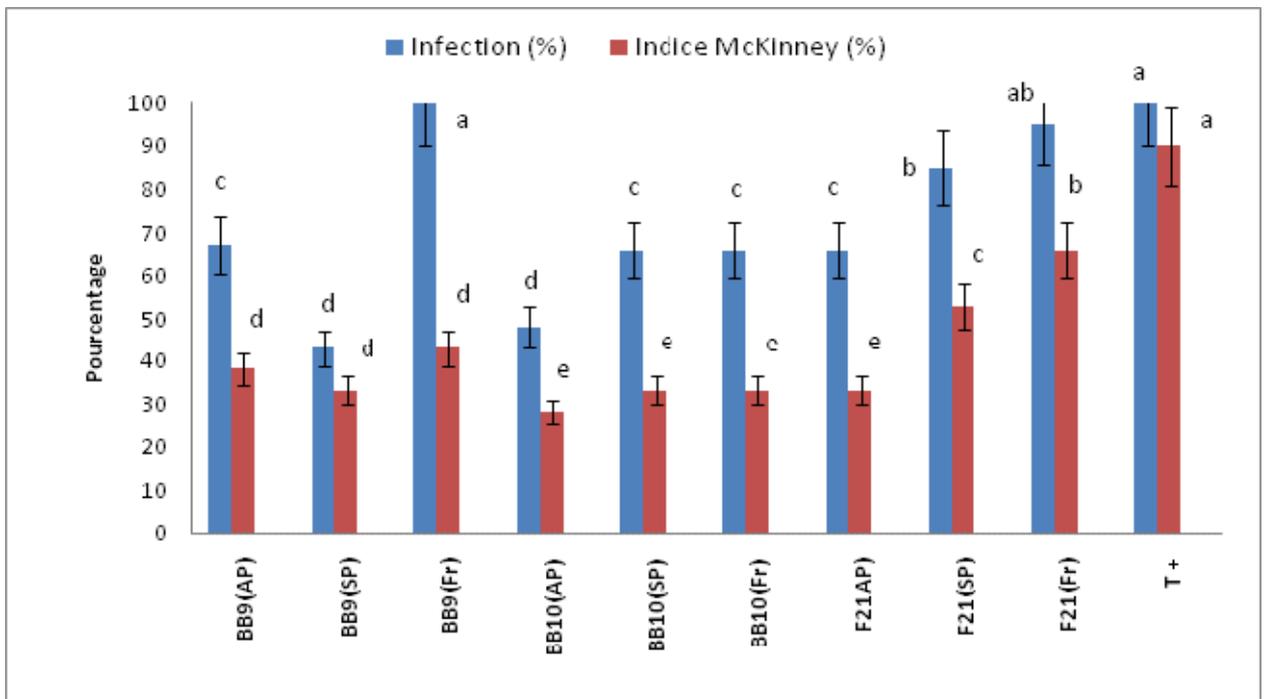


Figure V.8 : brunissement des racines des plants malades

V.3.3.2. Stade ultime (54 jours) de la fusariose vasculaire

La souche F21 affiche une efficacité limitée, notamment en état de crème fraîchement préparée et en lyophilisat sans protecteur. La bactérisation n'a pas éliminé totalement le développement de l'infection, mais ce qui est remarquable c'est

la sévérité qui a diminué, dénotant une régression dans la virulence où les taux d'inhibition sont parfois au-delà de 40 % (Figure V.9). La comparaison entre les souches ne fait ressortir une souche typique, même si les observations mentionnent des niveaux d'inhibition légèrement supérieurs et significatifs (groupe homogène e), quel que soit son état lyophilisé ou culture fraîche. La symptomatologie s'est stabilisée au stade primaire de jaunissement généralisé, considéré comme une légère infection chez tous les plants bactérisés, par rapport au témoin où tous les plants sont morts (Figure V.10).



T + :Témoin malade, AP : lyophilisé Avec Protecteur SP : Lyophilisé Sans Protecteur Cr ou Fr : Culture fraîche

Figure V.9 : Stade ultime (54 jours) de la fusariose vasculaire



Figure V.10 : Bioprotection des plants de tomate

V.3.4. Observation microscopique

Des coupes réalisées au niveau des racines, collets, tiges inférieures, et des tiges supérieures des plants infectés par F.o.L permettent de dégager les vaisseaux sur le microscope photonique et de constater qu'ils ont une teinte brune très marquée sur les tissus corticaux nécrosés. Cette coloration brune sombre des vaisseaux confirme les symptômes typiques externes et confirme l'installation de la maladie de la fusariose vasculaire sur les plants infectés (voir figure.V.11 et figure.V.12).

Nous remarquons que la coloration brune sur les tissus corticaux est manifesté au centre de la racine et collet, et dans les coté de la tige inférieure et de la tige supérieure ce qui confirme les symptômes externes typiques de la maladie caractérisé par le jaunissement unilatérale et le flétrissement unilatérale. (Voir figure.V.11 et figure V.12.).

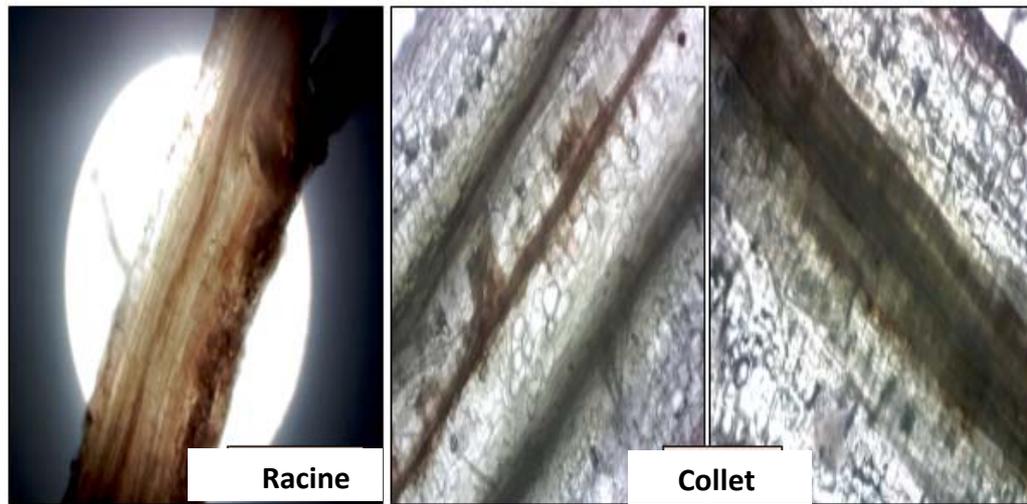


Figure V.11 : observation sur microscope photonique au des symptômes internes typiques de F.O.L d'une plante infecté et bactériisé par BB10 S.P

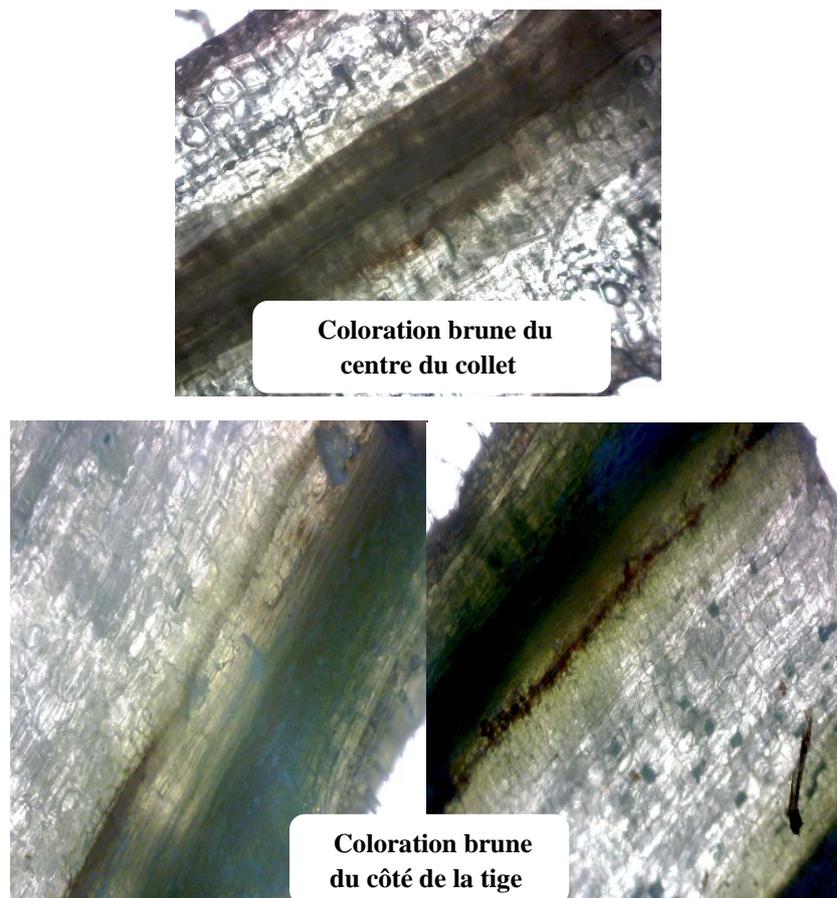


Figure V.12 : observation microscopique des symptômes internes typiques de F.O.L d'une Plante infecté et bactériisés par F21 S.P.

V.3.5 Colonisation rhizosphérique

L'essai de la vérification de la survie des *Pseudomonas* spp. fluorescents au niveau des rhizosphères des plantes des différents traitements ont montré après 24 h à 48 h d'incubation, la présence des colonisations notables de ces bactéries sur les fragments racinaires et révélé une culture bactérienne fluorescente verte tout autour des fragments racinaires chez toutes les racines des plants bactérisés. Leur présence sur toute la surface de la boîte de Pétri confirme la présence des PGPR appliqués (Figure V.13).

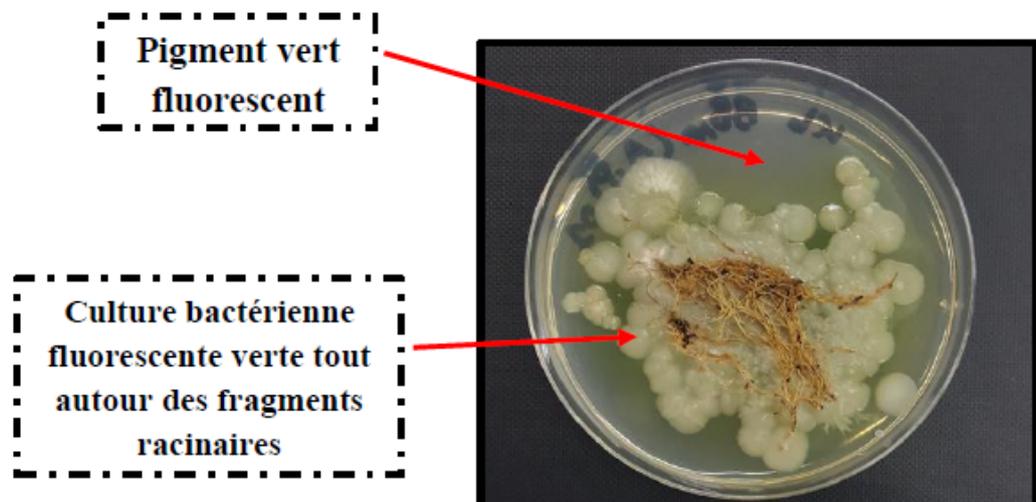


Figure V.13 : Colonisation racinaire d'une plante bactérisée (BB10 avec protecteur).

V.3.6 Phytostimulation

Globalement les gains sont considérables, témoignant d'une activation de la croissance, en réponse aux effets positifs de la bioprotection. Les réactions sont variables selon le paramètre considéré, mais d'apparence plus importante en partie aérienne (Figure 14). Le calcul des gains, par comparaison des plants bactérisés et sans bactérisation, a révélé des taux assez conséquents notamment en biomasse des parties aériennes et en hauteur des tiges. Avec les plants bactérisés par la souche BB9 lyophilisée (avec protecteur) les taux sont les plus élevés, respectivement 85 % et 68 % (Figure V.15.).

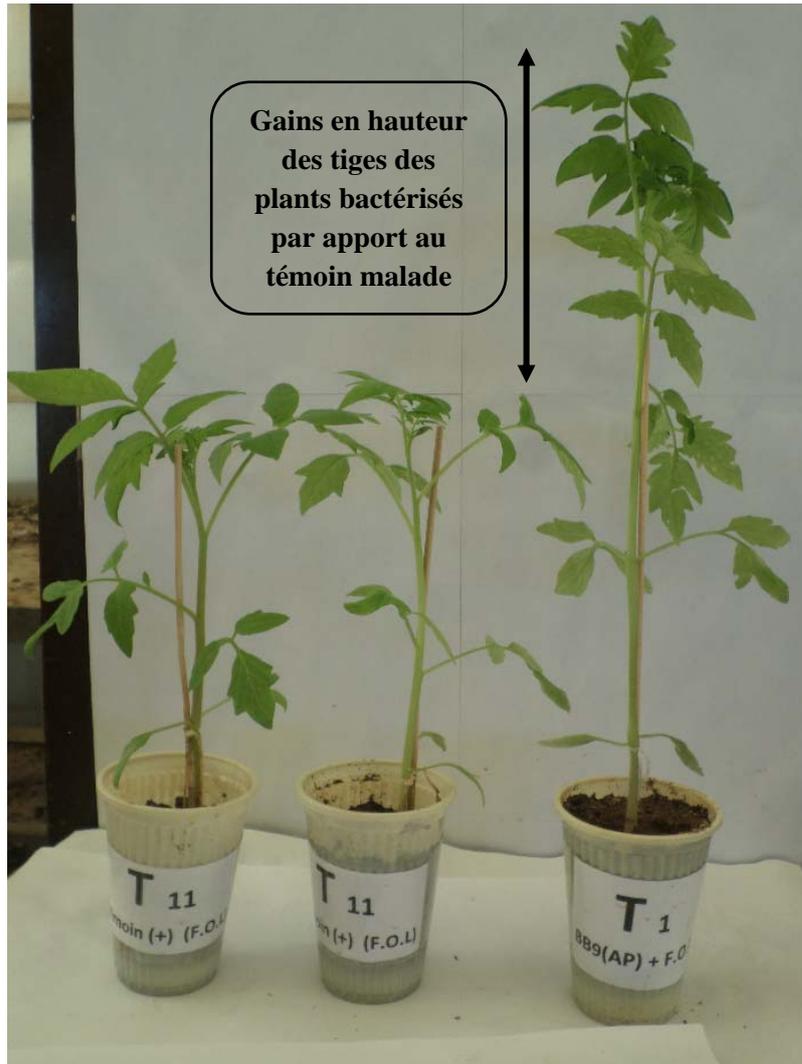


Figure V.14 : Promotion de la croissance de la partie aérienne des plans bactérisés par rapport au témoin positif.

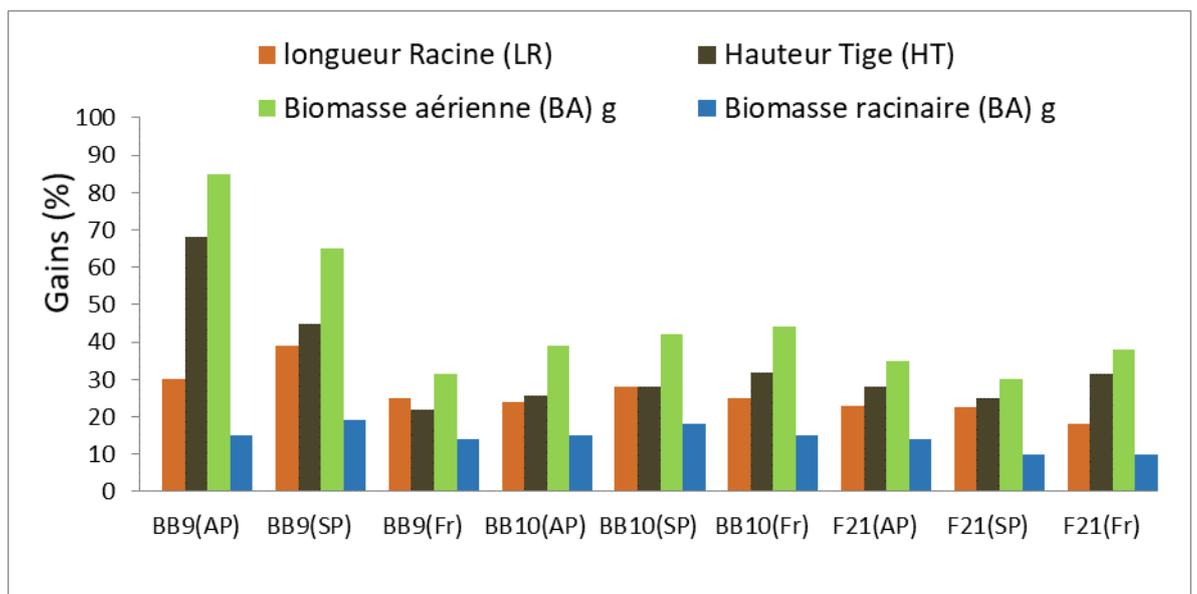


Figure V.15 Gains (%) en paramètres de croissance

Le calcul des gains en chlorophylle totale montre une bonne stimulation de l'activité photosynthétique, se traduisant par des gains pour tous les plants bactérisés, avec une large supériorité chez ceux qui sont bactérisés avec la souche BB9 (68 à 210 %). Chez les autres traitements les gains calculés varient entre 45 à 78 % (Figure V.16)

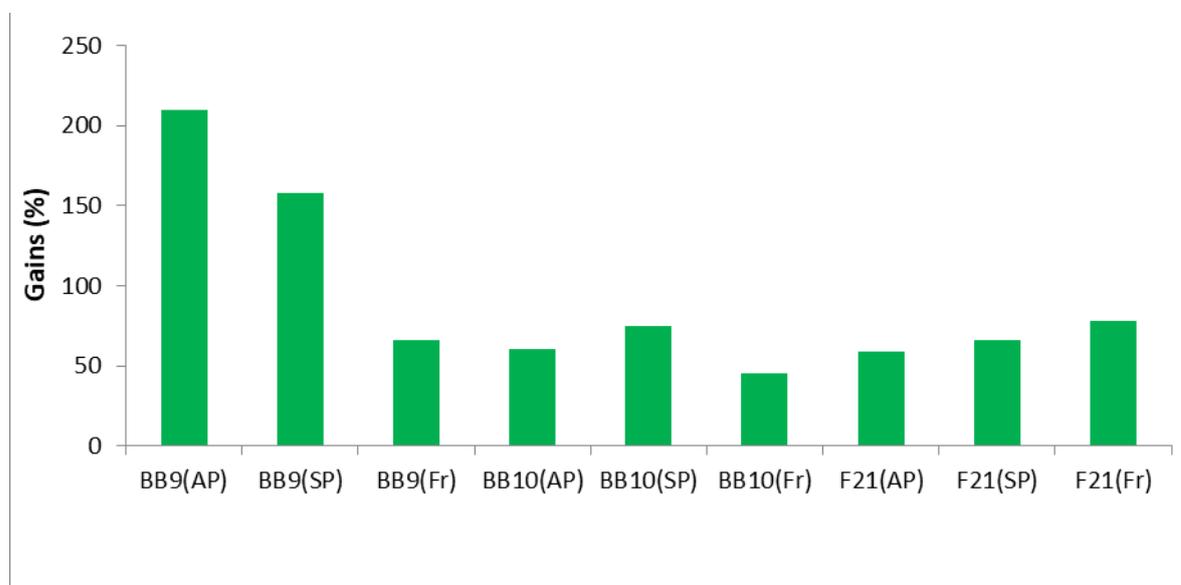


Figure V.16 Gains (%) en teneur chlorophyllienne

V.4. Discussion

L'utilisation de micro-organismes bénéfiques comme biopesticides pour réduire les maladies de diverses cultures d'importance agronomique est considérée comme l'une des méthodes les plus prometteuses dans les pratiques de gestion des cultures. Dans la présente étude, nous avons évalué l'efficacité, *in vitro* et *in planta*, de souches de *P. fluorescens* lyophilisées afin de déterminer l'impact de la lyophilisation sur l'efficacité de ces souches en tant qu'agents de biocontrôle contre *F. oxysporum* f.sp *lycopersici*.

Les trois milieux de culture utilisés ont permis l'expression de l'antagonisme par les trois souches de *Pseudomonas*, et ce malgré les différences dans leur composition chimique et son influence sur la synthèse des métabolites dont le rôle dans le biocontrôle est reconnu, à l'exemple du milieu KB qui favorise la synthèse de sidérophores, contrairement au milieu PDA. L'inhibition de la croissance mycélienne même faible observée sur le milieu PDA suggère que l'inhibition observée n'était pas due à l'action des sidérophores mais que d'autres mécanismes (antibiose principalement) avaient été développés par la bactérie, contrairement à la croissance

mycélienne sur milieu KB, ce qui peut être corrélé avec la présence des sidérophores.

Il a été démontré précédemment que l'action antagoniste de ces mêmes souches ne semblait pas être spécifique à l'agent pathogène, mais dépendait plutôt de le milieu de culture (Toua *et al.*, 2013). Dans certains cas, une efficacité à large spectre a été observée, agissant simultanément sur plusieurs isolats fongiques de genres différents (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium* et *Pythium*) (Benchabane, 2005). La variabilité de l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* dans les milieux testés suggère une diversité des mécanismes impliqués dans le contrôle biologique. Outre le déterminisme plurifactoriel de l'antagonisme, nos résultats soulignent la possibilité d'une efficacité large et non spécifique contre l'isolat de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. La différence de stimulation ou d'inhibition mycélienne dans les milieux de culture résulte de mécanismes physiologiques dans les conditions de culture.

D'une façon globale, la souche de *Pseudomonas* la plus active était F21 lyophilisée (54.16%), son performance peut être corrélée à son pouvoir métabolique, notamment secondaire. Les trois souches de *P. fluorescents* (lyophilisées et non lyophilisées) utilisées dans nos expériences ont montré des effets antagonistes variés contre Fol. Ces souches de rhizobactéries sont caractérisées par des potentialités différentes en termes de production de métabolites impliqués dans le biocontrôle, telles que la synthèse de pyoverdine et la variation (+ ou -) d'autres caractéristiques, notamment la synthèse de phénazines et la production de HCN (tableau V.1).

Le fer est un élément indispensable à la germination conidienne. La production en quantité importante de métabolites chélateurs de Fe⁺³, permet aux *Pseudomonas* spp. fluorescents de s'appropriier le fer nécessaire à leur croissance et de le rendre inassimilable pour les autres microorganismes (Lemanceau *et al.*, 1986; Jacques *et al.*, 1993). Des effets inhibiteurs par des pseudobactines purifiées des souches WC358 et WC417 de *Pseudomonas putida* ont été obtenus *in vitro* sur la germination conidienne de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Duijff *et al.*, 1993) et de *F.oxysporum* f.sp.*lini* (Reddy, 1992). Cependant Weller *et al.*, (1988), ont rapporté que la compétition pour le fer n'est pas le seul mode d'action des *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes. Fravel (1988), a montré l'absence de corrélation entre l'activité antagoniste des *Pseudomonas* spp. fluorescents et la concentration en

pigment fluorescent, même si ces bactéries sont plus aptes que les *Fusarium* à mobiliser le fer. Ces rhizobactéries possèdent d'autres mécanismes inhibiteurs, qui peuvent être liés à la synthèse d'antibiotiques et à d'autres types de métabolites secondaires à effet d'antibiose (Lemanceau, 1988; Lemanceau, 1992). Selon Figueroa-Lopez et al., (2016), l'analyse de l'activité antagoniste *in vitro* a révélé que la souches de *Pseudomonas fluorescens* produit des glucanases, des protéases ou chitinases, ainsi que sidérophores et auxines et suggèrent que ces mécanismes de contrôle sont possibles contre *Fusarium verticillioides* de maïs.

D'autres métabolites produits par ces *Pseudomonas spp* fluorescents peuvent également interférer avec la croissance des phytopathogènes ; il s'agit d'enzymes mycolytiques, de l'acide cyanhydrique ou de l'ammoniaque (Jacques et al.,1993). D'après les travaux de Howell et Stipanovic (1980), de nombreuses molécules antibiotiques sont impliqués, notamment la pyolutéorine et la pyrrolnitrine. Ces antibiotiques ont inhibé *in vitro* la croissance de *Pythium ultimum* et de *Rhizoctonia solani*. Il a été démontré également que certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* ont la capacité de produire le 2,4 diacétylphloroglucinol (PhI) qui se caractérise par des effets d'antibiose (Keel et al., 1990, 1991).

Les essais d'antagonisme conduits *in situ* vis à vis des fusarioses de la tomate ont mis en évidence une action globalement similaire des souches de *Pseudomonas* lyophilisées et non lyophilisées. Cette action s'est traduite par une réduction du taux d'infection (nombre de plants malades) et de la sévérité des symptômes. Les souches BB9 et BB10 ont exercé un contrôle sur la maladie, contrairement à F21 (crème fraîchement préparée et en lyophilisat sans protecteur). Toutes les souches actives présentent un profil de synthèse de métabolites secondaires qui les prédisposent à un pouvoir de bioprotection.

L'application des *Pseudomonas spp.* fluorescents assure une bioprotection significative des plants de tomate vis-à-vis de la fusariose vasculaire. Cette bioprotection s'est montrée variable selon les souches appliquées. Malgré l'apparition et l'évolution de l'infection chez tous les traitements étudiés, les situations de bactérisation ont influencé positivement le développement des plants de tomate en réduisant la maladie avec des degrés appréciables. Les plants bactérisés montrent une tolérance à la fusariose vasculaire, se manifestant par un ralentissement de la cinétique de la maladie par rapport aux témoins positifs, caractérisés par une progression assez rapide et vigoureuse.

La comparaison entre le taux d'infection et la sévérité de la maladie (Indice de Mckinney) permet de constater que malgré la progression de la maladie, la sévérité reste moins développée sur les plants bactérisés par rapport aux témoins positifs.

Dans cette étude, globalement, les souches de rhizobactéries les plus actives étaient BB9 et BB10 quel que soit leur état lyophilisé ou culture fraîche et leurs activités antagonistes peuvent être corrélées à leurs caractères métaboliques, notamment leurs métabolites secondaires (phénazines de la souche BB9) (Tableau V.1). L'inefficacité de la souche F21 contre *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* est probablement liée à son origine rhizosphérique. On distingue généralement deux types de suppression de maladie: (i) la suppression de maladie spécifique (Weller et al., 2002) est provoquée par un ou plusieurs micro-organismes spécifiques (génotypes), tels que les *Pseudomonas* produisant du phloroglucinol supprimant *Gaeumannomyces graminis* (Raaijmakers et Weller, 1998) et (ii) la suppression générale de la maladie est provoquée par plusieurs microorganismes agissant contre de multiples agents pathogènes et est rétablie rapidement après une perturbation majeure (Hoitink et Boehm, 1999). La présence d'antagonistes agissant spécifiquement peut se produire n'importe où, mais elle semble être dominante dans le sol rhizosphérique et, par conséquent, elle n'est pas entièrement compatible avec la suppression des agents pathogènes (Termorshuizen et Jeger, 2008).

La réduction de la sévérité de la maladie causée par Fol au cours de notre essai sous serre, peut-être expliquer par plusieurs mécanismes de bioprotection en produisant des sidérophores, acide cyanhydrique, Phenazines (Phz), et certaines enzymes de dégradations de parois cellulaire tels que la protéase et chitinase (Tableau V.1). Il apparait clairement que ces mécanismes responsables des effets de certaines souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents reposent sur leurs activités antagonistes par la production des métabolites secondaires à l'encontre des agents phytopathogènes (Digat, 1994).

Les *Pseudomonas* excrètent des molécules qui inhibent la croissance des phytopathogènes notamment les antibiotiques (Jacques et al., 1993). Ces métabolites sont capables d'interférer avec la germination, la croissance mycélienne, la physiologie cellulaire et/ou la sporulation des agents phytopathogènes (Lepoivre, 2003). Plusieurs antibiotiques sont synthétisés par les *Pseudomonas*, tels que l'acide phénazine-1-carboxylique, 2,4diacetyl phoroglucinol (DAPG), oomycine, pyoluteorine, pyrrolnitrine, kanosamine, zwittermycine-A, pantocine (Fernando et al.,

2005; Suty,2010), la viscosamide et les butyrolactones .Ces molécules sont impliquées dans le biocontrôle (Raaijmakers *et al.* 1995; Haas et Keel 2003; Haas et Defago 2005).

Les *Pseudomonas* fluorescents produisent d'autres métabolites, de nature volatile qui peuvent interférer avec la croissance des phytopathogènes. Il s'agit de l'acide cyanhydrique (HCN) (Jacques *et al.*, 1993) et les butyro-lactones (Suty ,2010). D'après les travaux de Neito *et al.*, (2013), Hernández *et al.*, (2016), Meyer *et al.*, (2016), plusieurs souches de *Pseudomonas fluorescens* produisent divers composés diffusibles et volatils impliqués dans la protection des plantes contre plusieurs agents phytopathogènes. Ces métabolites secondaires avec des propriétés antifongiques et antibactériennes tels que le cyanure d'hydrogène et le 2,4diacetyl phoroglucinol (DAPG) assurent le contrôle biologique des agents phytophthogènes comme le *fusarium oxysporum spp. lycopersici* agent causale de la fusariose vasculaire de la tomate et *Fusarium oxysporum f. Sp. Niveum* (Fon) agent causale de la fusariose de pastèque.

D'après l'hypothèse de Sedra et Maslouhy (1994), selon laquelle ces antagonistes sécrètent des substances antibiotique, ces dernières agissent sur le parasite par une lyse du mycélium ; ceci est à l'origine du phénomène d'aplatissement des colonies observé face aux antagonistes.

La réduction de la maladie peut être également, le résultat d'une colonisation importante des racines ou des sites de l'infection par ces rhizobactéries bénéfiques, ce qui réduit l'espace nécessaire à la croissance du pathogène (Jacques *et al.*, 1993 ; Suty, 2010). Ces caractéristiques expliquent leur aptitude à s'installer en nombre et durablement sur et à proximité des racines (Latour et Lemanceau, 1997). La colonisation des tissus de la plante joue un rôle primordial dans le biocontrôle (Chin-A-Woeng *et al.*, 2000).

Les résultats de la vérification de la viabilité et de la dynamique microbienne ont confirmé la survie des *Pseudomonas spp.* fluorescents utilisés dans nos essais et leur capacité de coloniser la rhizosphère et se multiplier sur les racines des plants de tomate. Les *Pseudomonas* fluorescents sont connus par leur forte colonisation des racines, leur utilisation de plusieurs substrats comme source de carbone et la diversité de leur métabolisme (Latour et Lemanceau, 1997 ; Whipps, 1997 ; Misko *et Germida*, 2002 ; Lugtenberg *et Kamilova*, 2009).

La croissance et l'activité du système racinaire induisent des modifications non significatives des propriétés physico-chimiques et biologiques du sol entourant la racine (effet rhizosphérique) dues à la rhizodéposition. La capacité à prendre en charge certains agents de lutte biologique varie selon les espèces de plantes, les cultivars et les génotypes (Lucy et *al.*, 2004). La sécrétion de rhizodéposition est un moyen important pour les plantes de réagir à leur environnement. Les exsudats racinaires facilitent la communication entre les plantes et d'autres organismes (agents pathogènes et antagonistes) et stimulent les réactions de défense contre les agents pathogènes du sol et / ou favorisent l'association à des agents bénéfiques. L'espèce végétale, le cultivar et le stade phénologique jouent également un rôle primordial dans la modulation de la quantité et de la qualité des exsudats de racines, similaire aux réactions physiologiques aux facteurs de stress lors du développement de micro-organismes dans la rhizosphère et à leur adhésion aux composés de la racine (Nelson , 1991; Lugtenberg et *al.*, 1999)

Les résultats de la bactérisation de la plante avec les souches de *P. fluorescens* ont montré divers degrés de bioprotection qui ont été invoqués chez la tomate, ainsi que dans d'autres plantes (Kloepper et *al.*, 1980; Maurhofer et *al.*, 1995; Raaijmakers et Weller, 1998). Les PGPR antagonisent les champignons phytopathogènes, principalement par la production de métabolites antimicrobiens, mais aussi par la compétition pour les niches de fer ou de rhizosphère (Keel et *al.*, 1992) et la stimulation des défenses de l'hôte (résistance systémique induite) (Van Loon et *al.*, 1998). D'autres mécanismes sont directement impliqués dans la promotion de la croissance des plantes et modulent l'activité de biocontrôle de la bactérie (Lemanceau et Alabouvette, 1993; De Werra et *al.*, 2009).

Les résultats du réisolement de l'agent pathogène de la fusariose vasculaire à partir des fragments racinaires et des tiges de plants infectés par F.O.L révèle un développement mycélien intense après 48 h d'incubation comparativement avec les plants bacterisés et infectés par Fol. La germination des conidies de FOL est déclenchée par les exsudats de la tomate (Kamilova et *al.*, 2008). Selon Olivain et Alabouvette, (1999), les souches pathogènes de FOL colonisent rapidement la surface des racines de leur plante hôte (tomate) en formant un réseau dense d'hyphes.

Les signaux affectant la germination des spores de *F. oxysporum*, l'agent pathogène de la tomate, ne semblent pas être spécifiques à l'hôte, un schéma

similaire de germination microconidiale ayant été observé en présence d'exsudats de racines de la plante tomate hôte et de plusieurs plantes non hôtes (poivrons, haricots, orge, tabac et concombre). Cependant, certains signes indiquent que les composés présents dans les exsudats de racines de tomate ont un effet spécifique et il a été rapporté que le taux de germination de plusieurs souches de *F. oxysporum* est affecté différemment par les exsudats de racines de tomate (Steinkellner et al., 2008). Aucune différence dans le développement mycélien de *F. oxysporum* n'a été observée à proximité des racines de tomate et de blé, de sorte que les plantes non hôtes peuvent fonctionner comme des porteurs asymptomatiques de la fusariose (Steinberg et al., 1999). La variation observée peut être attribuée à la variation biologique des souches fongiques et / ou des structures cellulaires.

Cependant, d'autres études sont nécessaires pour caractériser les composés de signalisation dans les exsudats de racines de plantes susceptibles d'être impliqués dans les interactions des plantes hôtes avec *F. oxysporum*. Les processus de développement des spores étant essentiels à la reproduction et à la survie des champignons. La germination des spores d'un champignon phytopathogène peut être considérée comme une étape cruciale du développement de la pathogenèse : la germination doit avoir lieu à la fois au bon moment et au bon endroit pour que l'infection soit efficace (Seong et al., 2008).

Le processus d'infection de *F. oxysporum* comprend les étapes suivantes : germination des spores en réponse à des exsudats de racines, production d'hyphes de pénétration qui s'attachent à la surface de la racine et la pénètrent directement, et croissance envahissante dans les tissus de la plante hôte (Rodríguez-Gálvez et Mendgen , 1995). La stimulation des agents phytopathogènes par les exsudats de racines fait partie intégrante du concept de potentiel d'inoculum (Lockwood, 1986) et de nombreuses études ont été menées sur la biologie de *F. oxysporum* et le processus de colonisation (Steinkellner et al., 2008). Les exsudats de racines sont supposés jouer un rôle clé dans la détermination du résultat positif ou négatif d'une interaction dans la rhizosphère par divers métabolites appelés stimuli généraux de la germination des spores (Nelson, 1991 ; Bais et al., 2006).

À différents stades de croissance, les racines des tomates dégagent des quantités variables de sucres et d'acides organiques et, en fonction de l'âge de la plante, l'effet des exsudats de racines de tomates sur la germination des spores de

l'agent pathogène de la tomate *F. oxysporum* varie également (Lugtenberg et al., 1999; Steinkellner et al., 2008).

Il a été rapporté que l'application préalable d'un agent biologique inducteur (*Pseudomonas spp.* fluorescents) déclenche ou active les mécanismes de défense latents des plantes, en réponse à l'infection avec les pathogènes (Ramamoorthy, 2002). L'application de ces rhizobactéries sous conditions de serre déclenche l'ISR, qui protège significativement le radis vis-à-vis de la fusariose vasculaire et augmente le rendement de 40 % (Leeman et al., 1995).

De même, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) produit par *P. fluorescens* CHA0 et Q2-87, possède une action inhibitrice directe sur les pathogènes, en même temps, il est essentiel pour induire des réactions de défense chez *Arabidopsis* et chez la tomate (Audenaert et al., 2002; Siddiqui et Shaukat 2002; Weller et al., 2004). Selon Saikia et al., (2003), *P. fluorescens* induit la résistance systémique chez le pois chiche et réduit la sévérité de la fusariose vasculaire avec des taux allant de 26 % à 50 %.

En plus de l'effet protecteur des souches lyophilisées et non lyophilisées en interaction avec le pathogène, l'essai *in planta* de la promotion de la croissance par l'utilisation des de *Pseudomonas* a montré une amélioration de la croissance végétale. L'amélioration est significative sur les paramètres de croissance étudiés ainsi que sur les teneurs en chlorophylle totale comparés au témoin non inoculé. Cette amélioration a permis une augmentation une biostimulation remarquable en hauteurs des plants, et phytomasse des parties aériennes et souterraines chez les des plants bactérisés par les isolats de *Pseudomonas*. Le calcul des gains a révélé des taux assez conséquents notamment en biomasse des parties aériennes et en hauteur des tiges. Avec les plants bactérisés par la souche BB9 lyophilisée (avec protecteur) les taux sont les plus élevés, respectivement de 85 % et 68 %.

D'après les travaux de Kamal et al., (2008), l'application de *Pseudomonas* fluorescents entraîne une augmentation de la longueur du système racinaire et de la partie aérienne, du poids sec ainsi que le rendement en tomates. Il a été rapporté que ces bactéries jouent également un rôle dans la promotion de la croissance par la production d'hormones végétales, telles que les auxines les gibberellines et d'autres substances favorisant la croissance (Figuroa-Lopez et al., 2016). La synthèse d'AIA par les *Pseudomonas* est très bénéfique pour la croissance et le développement végétal, elle est largement répandue chez ces rhizobactéries et environ 80% des

bactéries rhizosphériques sont capables de produire cette phytohormone (Khan 2014). L'acide indol-3-acétique (IAA) est une phytohormone qui influence de nombreuses fonctions cellulaires chez les végétaux et par conséquent, est considérée comme un régulateur important de la croissance et du développement des plantes. Cette phytohormone est impliquée dans l'initiation de la division des cellules au niveau des racines et de leur élargissement. Cet effet engendre une surface racinaire plus grande, avec une meilleure accessibilité pour plus de nutriments pour la plante et par conséquent stimule efficacement sa croissance.

L'amélioration de l'alimentation minérale de la plante en phosphore a été parmi les premières hypothèses proposées pour expliquer l'effet bénéfique engendré par la bactérisation des plantes (Weller 2007). Les *Pseudomonas* spp. fluorescents, augmenteraient la concentration en phosphore soluble soit par minéralisation des phosphates organiques, grâce à des phosphatases, soit par solubilisation des phosphates inorganiques sous l'effet d'acides (Berthelin et al. 1991). La relation entre la solubilisation du phosphate et le pH indique que les conditions acides observées par la diminution du pH, joueront un rôle dans la solubilisation de phosphate (Taguet, 2015).

Les résultats de l'essai *in planta* obtenus par la présente étude sur l'effet, révèlent une augmentation significative sur les teneurs en chlorophylle totale comparés au témoin non inoculé. Les meilleurs résultats ont été obtenus par la souche BB9 (68 à 210 %) comparativement aux autres traitements (F21 et BB10) ou les gains calculés varient entre 45 à 78 %. Nos résultats concordent avec ceux d'une étude réalisée par Boukerma et al., (2017) ; ou la teneur en chlorophylle des plantes bactérisées par rapport aux témoins, a montré une augmentation des pigments de chlorophylle chez les plants de tomate traités avec les souches de *Pseudomonas fluorescens* PF15 and *Pseudomonas putida* PP27 ou leur combinaison. Cependant, les témoins présentent une faible valeur d'indice de chlorophylle.

Selon Sharma et al., (2003) et Farhan et al., (2010), les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescentes peuvent augmenter les teneurs totale en chlorophylle dans les plantes cela révèle l'effet positif des PGPR appliquées sur la physiologie végétale. La capacité des *Pseudomonas* spp. fluorescents d'augmenter le niveau en chlorophylle totale chez les plantes peut être liée à leur approvisionnement en certains éléments nutritifs tels que l'azote et le phosphore

(Hameed et Farhan, 2007). D'après les travaux de Browne et al., (2009) et Miller et al., (2010), les *Pseudomonas* spp. fluorescents possèdent une grande capacité de solubiliser le phosphate, en produisant des acides organiques et des phosphatases acides (Rodríguez et Fraga, 1999). Il a été signalé que la RuBisCO produite par les plantes bactérisées avec *P. fluorescens* KH-1 (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase - oxygénase) joue un rôle primordial dans la photosynthèse et l'accumulation de la chlorophylle (Agris, 2005 ; Kandasamy et al., 2009).

L'utilisation des rhizobactéries comme le genre de *Pseudomonas* spp. fluorescents favorisent la croissance des plantes en agriculture, peut permettre de stimuler la croissance des plantes et d'inhiber l'action des pathogènes. L'emploi des PGPR modifiés génétiquement ou non peut permettre de diminuer l'utilisation des pesticides (Beauchamp, 1993). Plusieurs études corroborent nos résultats, Asha et al., (2011), ont confirmé que les *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été efficaces pour favoriser la croissance des plantes dans des conditions de terrain (Ramamoorthy et al., 2002) et interviennent sur l'augmentation de la germination des graines, de la vigueur des semis, croissance des racines, croissance des pousses, la biomasse totale des plantes, poids de graines, et le rendement des fruits, etc (Van Loon et al., 1998 ; Ramamoorthy et al., 2001 ; Nezarat et al., 2009). Ces activités de promotion de la croissance des plantes de *P. fluorescens* a été signalé dans des cultures telles que le riz, le blé, Sorgho, tomate, Concombre et tournesol (Prasad et al., 2002 ; Niranjan et al., 2004 ; Jeun et al., 2004).

A travers nos résultats, nous considérerons que la lyophilisation est une technique préconisée dans le cas des *Pseudomonas* spp. fluorescents vue que c'est une technique appropriée pour la production de cultures bactériennes concentrées, une méthode établie pour préserver les micro-organismes en gardent toutes leurs viabilités et efficacités avec l'avantage que le matériel séché peut être stabiliser, stocké à température ambiante pour de longues périodes, facilement transporté et manipulée. Par contre, pour que la lyophilisation soit prioritaire et recommandé aux souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents par rapport aux autres traitements physiques préexistants, il est conseiller d'apporter une cryoprotection avant le processus de lyophilisation.

Discussion générale

Discussion générale

Il est reconnu que les espèces du genre *Pseudomonas*, de par leur ubiquité, sont fréquemment isolées de différentes niches écologiques. Certaines peuvent agir comme des pathogènes des animaux des plantes ou des champignons, alors que d'autres sont des bactéries bénéfiques vivant librement dans le sol (Achouak *et al.*, 2000). Les études de microbiologie du sol sont assez vastes, concernant la présence et l'implication des *Pseudomonas* dans les cycles géochimiques, dans les processus de pédogenèse, dans leurs interactions à différents niveaux avec les autres communautés microbiennes telluriques et avec les plantes. Avec ces dernières les relations sont très diversifiées et se présentent sous les formes parasitaires, saprophytes et aussi mutualistes.

Les prélèvements de sols à partir des quatre biotopes étudiés ont permis de constater l'existence de densités appréciable en populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Ceci témoigne de l'adaptation de ces rhizobactéries à ces biotopes dont les caractéristiques pédoclimatiques et végétales sont pourtant relativement différentes. Les fréquences de ces bactéries sont variables en fonction du biotope considéré. La colonisation des sols de palmeraies s'est montrée considérable, où la fréquence d'isolement de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents a atteint 70%, même si les conditions de sol et de climat sont relativement extrêmes pour l'activité microbienne mésophiles. Donc, d'une part la plante peut exercer des effets directs sur la modification des caractéristiques physico-chimiques et biologiques du sol, modulant ainsi sa réceptivité et sa colonisation par les microorganismes. D'autre part, nous constatons que les prélèvements des sols des autres cultures (pommier, poirier et tomate) sont aussi assez riches en espèces de *Pseudomonas*. Donc, outre les caractéristiques purement pédologique et climatique, la plante, par le biais de ses exsudats racinaires, notamment quand il s'agit de plantes pérennes dont l'effet rhizosphère se construit à long terme, peut exercer un effet sélectif interactif avec les communautés microbiennes telluriques.

L'effet rhizosphère engendre des modifications biotiques et abiotiques dans le sol sous l'influence de la plante. La population bactérienne de la rhizosphère est 100 à 1000 fois plus élevée que celle du sol environnant. La rhizosphère est fortement influencée par des entités microbiennes possédant une polyvalence métabolique adaptée à l'utilisation efficace des exsudats racinaires (Latour *et al.*, 1997; Latour *et*

al., 2003). Les racines des plantes synthétisent, accumulent et sécrètent un large éventail de composés et de substrats, dont les caractéristiques chimiques modifient régulent la structure de la communauté microbienne évoluant aux alentours des racines (rhizoplan et rhizosphère) (Lemanceau, 1992; Dakora et Phillips, 2002).

En utilisant une approche polyphasique pour une identification aussi précise que possible, des souches sélectionnées des quatre biotopes, nous avons adopté les méthodes de l'identification phénotypique décrites par Digat et Gardan (1987) inspirées de Stanier *et al.*, (1966), la clé dichotomique proposée par Bossis (1995), le recours au système BIOLOG GENIII et les méthodes génotypiques avec l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S. L'identification taxonomique a permis de retrouver les principales espèces du groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents avec une nette dominance de *P. fluorescens*. Même si les fréquences d'isolement des autres espèces (*P. putida*, *P. aureofaciens* et *P. chlororaphis*) sont moindres, leur présence témoigne de l'ubiquité et des capacités d'adaptation de ces rhizobactéries aux différentes conditions écologiques et agronomiques caractérisant nos biotopes.

Il est à souligner que les caractérisations phénotypiques utilisées n'ont pas permis de réaliser une identification totale et précise. De plus la comparaison des résultats obtenus par ces méthodes fait ressortir des divergences entre elles. La détermination des profils trophiques des souches a mis en évidence une grande diversité dans leur métabolisme carboné ; néanmoins il n'y pas eu de concordance entre les résultats de l'identification et les profils trophiques, ce qui révèle les limites des tests phénotypiques d'identification des *Pseudomonas*. Ces résultats confirment la faiblesse de ces approches phénotypiques pour une caractérisation stable à l'échelle spécifique.

Nous revenons sur la faiblesse de la caractérisation taxonomique de ce groupe bactérien, qui n'est pas nouvelle ; elle a ouvert le champ à de nombreuses investigations et propositions, d'où de nombreux travaux récents proposent de nouvelles affiliations d'espèces. La majorité des études taxonomiques sur les *Pseudomonas* spp. fluorescents a révélé la complexité de la variabilité au niveau des différentes espèces appartenant à ce groupe (Palleroni et Doudorof , 1972; Palleroni *et al.*, 1984; Peix *et al.*, 2009). Sur le plan taxonomique, le travail réalisé sur ce groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents, dans des biotopes algériens montre cette complexité où il était difficile d'en réaliser une distinction précise entre les différentes espèces (Benchabane, 2005).

L'énorme hétérogénéité phénotypique et génétique démontrée chez les souches de *P. fluorescens* (Loper et al., 2012), a conduit à une évaluation imprécise de sa phylogénie, selon laquelle un complexe d'espèces façonne la phylogénie de cette espèce (Seaton et Silby, 2014). Une autre difficulté de ce groupe est la description fréquente de nouvelles espèces, telles que *P. protegens* (Ramette, 2011), et de sous-espèces, telles que *P. brassicacearum* subsp. *néoaurantiaca* (Ivanova et al., 2009), et l'inclusion de souches dans le groupe *P. fluorescens* (*P. sp.*UW4) (Duan et al., 2013). En somme même avec les outils moléculaires, l'imprécision taxonomique reste posée, notamment avec certaines espèces et leurs sous espèces. Nous assistons ces dernières années à des révisions taxonomiques, à de nouvelles espèces et au reclassement d'autres. Bien que le gène de l'ARNr 16S soit l'outil de base du système de classification bactérien actuel, il est connu que des espèces étroitement apparentées de bactéries ne peuvent pas être différenciées sur la base de ce gène. Ainsi, d'autres travaux utilisent d'autres séquences génétiques, codant pour des gènes d'entretien (ménages) à titre de marqueurs moléculaires (Sánchez et al., 2014), ou à travers l'analyse de séquence multilocus (MLSA) (Mulet et al., 2010), pour mieux appréhender la complexité de ce groupe bactérien.

L'efficacité des isolats de *Pseudomonas* fluorescents, à titre de microorganisme phytobénéfiques, notamment dans le biocontrôle des agents phytopathogènes et/ou la stimulation de la croissance et de la nutrition des plantes, dépendra évidemment sur la convergence d'une multitude de propriétés physiologiques, métaboliques et écologiques. De notre première partie de ce travail (chapitre II), il en est ressorti 17 isolats présentant des caractéristiques de candidature potentiellement recherchées. En effet, de nombreux isolats sont capables de synthétiser une multitude de métabolites secondaires reconnus comme importants dans le biocontrôle (Pyoverdines, Phénazines et HCN), ou encore en phytostimulation (AIA et Phosphatases).

L'essentiel était concentré sur les métabolites fortement prouvés dans leurs actions (chapitre III), notamment les sidérophores pour dépasser la limitation en fer et le fournir sous forme biodisponible et assimilable aux plantes (Vejan et al., 2016). Quelques isolats ont montré leur capacité de production *in vitro* de l'AIA et des phosphatases, dont leurs rôles ne sont pas à démontré en biostimulation et en nutrition phosphatée. L'AIA est un régulateur clé de nombreux aspects de la croissance et du développement des plantes, notamment la division et l'élongation

cellulaires, la différenciation, les tropismes, la dominance apicale, la sénescence, l'abscission et la floraison (Ahemad et Kibret, 2014). Les PGPRs solubilisent et minéralisent directement le phosphore inorganique ou facilitent la mobilité du phosphore organique par le renouvellement microbien et/ou augmentent le système racinaire (Richardson et Simpson, 2011). Le phosphore est impliqué dans les processus métaboliques des plantes, tels que la photosynthèse, le transfert d'énergie, la transduction du signal, la biosynthèse macromoléculaire et la respiration (Khan, et *al.*, 2010)

En termes de biocontrôle, la synthèse de l'HCN et de métabolites phénaziniques, retrouvées chez trois de nos souches (BB9, PI9, F21), constitue un atout dans les activités antagonistes et compétitrices dans la rhizosphère. D'ailleurs ces souches ont manifesté un pouvoir antagoniste important vis-à-vis des pathogènes fongiques et bactériens testés, se traduisant par une activité antimicrobienne inhibitrice à leur égard. Outre ces métabolites, les chitinases, les glucanases, les protéases et les lipases peuvent protéger les plantes de ces stress biotiques (Gupta *et al.*, 2015). Ces enzymes lytiques digèrent et déforment les composants de la paroi cellulaire des champignons pathogènes.

Une grande partie des métabolites secondaires synthétisés par les *Pseudomonas* spp. fluorescents présentent un large spectre d'action vis à vis d'agents phytopathogènes telluriques fongiques et bactériens. Ils sont caractérisés par des structures particulières nécessaires à leur action par complexation avec des composés organiques rhizosphériques. La production de ces métabolites est considérée comme l'un des moyens favorisant leur compétence écologique.

Les travaux de chapitre IV ont été orientés sur la conception de formulations, à base de souches bactériennes sélectionnées, en étudiant l'impact de la lyophilisation et d'estimer leur viabilité après stockage de longue durée. La lyophilisation est souvent sollicitée dans les procédés de conception des inoculats microbiens et selon les critères considérés, six souches (BB2, BB9, BB10, F21, PI9 et GP4) ont été retenues. L'analyse de la viabilité nous a semblé liée aux profils des souches bactériennes en acide gras membranaires. Six principaux acides gras ont été identifiés (palmitique, palmitoléique, stéarique, oléique, linoléique et linoléinique), qui peuvent en avoir un lien avec la thermorésistance des souches sélectionnées. Les acides gras saturés régulent la fluidité et la perméabilité membranaire chez les bactéries, notamment en situation de stress (Russell et *al.*, 1989).

Pour toute application de préparations bactériennes lyophilisées, l'obtention d'une concentration élevée en cellules viables et cultivables est requise. La détermination de cette viabilité cellulaire est systématique. Dans nos formulations, in fine, les analyses de cytométrie en flux montrent que la perte de viabilité est plus prononcée au cours du séchage qu'au cours du stockage. Le recours aux agents protecteurs (maltodextrine et glycérol), pendant le processus de lyophilisation n'a pas d'effets remarquables sur la viabilité bactérienne, cependant il influence positivement la stabilité des lyophilisats obtenues pendant les cinq années de stockage.

Dans la dernière partie de ce travail (Chapitre IV), la vérification de l'efficacité, en plus de la viabilité des lyophilisats bactériens conçus, apparaissent acceptables par rapports aux prérequis d'application. Les potentialités antagonistes restent significatives *in vitro* et *in situ*. La variation de l'activité antagoniste *in vitro* dépend non seulement des souches antagonistes, mais aussi du milieu de culture utilisé. Les essais d'antagonisme conduits *in situ*, vis à vis de la fusariose vasculaire de la tomate, confirment ceux obtenus *in vitro* concernant l'état des souches utilisées. Globalement, les actions restent similaires, en état de lyophilisats ou en cultures fraîchement préparées, dans la réduction des taux d'infection et de la sévérité des symptômes.

Dans le criblage de souches rhizobactériennes potentielles, Il est nécessaire de comptabiliser à la fois, les aptitudes d'adaptation et d'évolution dans les environnements rhizosphériques ; comme il en ressort également que leurs activités antagonistes puissent être corrélées à leurs métabolites secondaires qui seront impliqués de facto dans les effets phytobénéfiques désirables.

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans cette étude, des caractérisations ont été effectuées, *in vitro* et *in situ*, sur des souches de *Pseudomonas* isolées à partir de divers environnements (biotopes) du sud d'Algérie, dans l'objectif est d'aboutir à sélectionner celles qui sont douées d'effets phytobénéfiques, en phytostimulation et en biocontrôle des agents phytopathogènes. Notre travail a permis d'identifier des caractères (morphologiques, biochimiques, génomiques et métaboliques) reconnus aux *Pseudomonas* spp. fluorescents. 100 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents sont isolées des quatre biotopes (palmeraie, poirier, pommier et tomate), montrant ainsi l'ubiquité et l'adaptation de ce groupe bactérien, en particulier dans les sols cultivés (effet rhizosphère).

Les quatre espèces types de ce groupe *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis* et *P. aureofaciens* ont été retrouvées avec la prédominance de la première espèce, particulièrement de son biovar III (ou biotype). Il est à souligner que les caractérisations phénotypiques utilisées n'ont pas permis de réaliser une identification précise. Cependant, il n'y a pas de concordance entre ces résultats et ceux des profils trophiques. Nous réitérons les limites des tests phénotypiques pour une identification totale et précise des *Pseudomonas*. Les résultats obtenus par approche moléculaire en les comparants avec les résultats phénotypiques (clé dichotomique et Biolog GENIII) révèlent la complexité et la variabilité au niveau des différentes espèces. Cependant l'identification phénotypique et génotypique a révélé une forte hétérogénéité du genre *Pseudomonas*.

Le criblage, via les tests du pouvoir antagoniste, a dégagé 17 souches montrant de fortes activités inhibitrices *in vitro* vis-à-vis de phytopathogènes fongiques et bactériens. En explorant certains aspects du métabolisme secondaire, impliqués dans les activités phytobénéfiques, ces souches sont avérées productrices de : siderophores (Sid), de cyanure d'hydrogène (HCN), de l'acide indole-3-acétique (AIA, jusqu'à 18,3 µg/ml), de phosphatase, de chitinase, et d'enzymes protéolytiques.

Des composés phénaziniques, à effet antibiotique, ont été extraits et d'après les résultats d'antibiographie contre des germes-cibles, les extraits à l'acétate d'éthyle ont donné de meilleurs résultats par rapport aux dichlorométhane et l'hexane. Les analyses de ces composés, par chromatographie en couche mince (CCM) et chromatographie liquide à haute performance (HPLC), indiquent que les deux

souches PI9 et F21 sont productrices de l'acide phénazine-carboxylique (PCA). La souche BB9 est suspectée productrice d'un autre composé phénazinique ou d'un dérivé phénazinique.

Les résultats des essais de formulation de trois souches de *Pseudomonas*, en adoptant un protocole de lyophilisation non optimisé, montrent que leur viabilité est fortement affectée par les procédures de la lyophilisation. Le recours aux techniques de la cytométrie en flux a permis une meilleure détermination de l'état physiologique cellulaire (cellules viables, cellules mortes et cellules viables mais non cultivables). Les résultats, montrent que la souche F21 est la plus sensible à la lyophilisation. Cette sensibilité s'est traduite par une importante diminution de la concentration des cellules viables (de 34% à 0,8%). Une quantité importante en cellules intermédiaires (pas totalement viables) a été observée pour les souches BB9 (24,6%) et F21 (34,6%), que l'on peut récupérer en utilisant un milieu adéquat. Dans les essais de stockage des lyophilisats, les cryoprotecteurs ont pu influencer, relativement, la stabilité des préparations microbiennes séchées lors du stockage avec des taux de viabilité relativement variables (13,28% et 25,21%) enregistrés respectivement, avec les souches BB9 et F21.

Les résultats de l'application pratique des souches lyophilisées contre la fusariose vasculaire de la tomate montrent que la bactérisation n'a pas éliminé totalement le développement de l'infection, mais la sévérité a diminué de façon très significative, dénotant une régression dans la virulence où les taux d'inhibition sont parfois au-delà de 40 %. A travers nos résultats, il ressort que les actions restent similaires, en état de lyophilisats ou en cultures fraîchement préparées. La symptomatologie s'est stabilisée au stade primaire de jaunissement généralisé, considéré comme une légère infection chez tous les plants bactérisés, par rapport au témoin où tous les plants sont morts. Comme il a été démontré que ces souches ont induit des phytostimulations appréciables en hauteurs des plants, en phytomasse des parties aériennes et souterraines ainsi que sur les teneurs en chlorophylle totale.

Enfin, nous pouvons dire alors que la lyophilisation, même si la viabilité des souches est lourdement atteinte, mais les lyophilisats conçus gardent relativement leur efficacité en biocontrôle et en phytostimulation.

Que ce soit au niveau fondamental ou appliqué, de la compréhension du phénomène d'interaction plantes-microorganismes, de nombreuses perspectives découlent de cette recherche.

La poursuite de l'identification moléculaire des souches déjà identifiées par séquençage des gènes de ménage et l'analyse par MLSA ou (Multi Locus Sequence Analysis).

Des études plus approfondies sur les mécanismes biochimiques, moléculaires et physiologiques qu'exercent les bactéries sélectionnées, sont nécessaires pour améliorer nos connaissances dans ce domaine qui reste toujours sous-évalué.

D'un point de vue appliqué, un complément d'information, notamment protéomique est nécessaire pour concevoir une utilisation efficace et rationnée de ces bactéries, en tant que biopesticides et/ou biofertilisants. De ce fait, plusieurs expériences complémentaires doivent être réalisées, en l'occurrence, élargir le spectre des plantes hôtes et des pathogènes.

La procédure de lyophilisation adoptée nécessite son optimisation au vue des taux de viabilités obtenus. Ainsi, l'expérimentation et l'élaboration d'autres protocoles plus adaptés sont préconisées, en testant d'autres adjuvants ou agents cryoprotecteurs (CPA) pour rehausser les taux de viabilité, garantissant la conservation et l'efficacité des préparations lyophilisées.

Tester les souches bactériennes dans des phénomènes inductibles autres que ceux liés aux maladies biotiques, comme la résistance à des stress abiotiques (hydrique, thermique, salins) et leurs interactions avec les techniques culturales prônées en agriculture intégrée et durable.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abo-Elyousr K. A. M. et El-Hendawy H. H., 2008.** Integration of *Pseudomonas fluorescens* and acibenzolar-S-methyl to control bacterial spot disease of tomato. *Crop Protection*, 27, 1118-1124.
- Achouak W., Sutra L., Heulin T., Meyer J. M., Fromin N., Degraeve S., Christen R. et Gardan L., 2000.** *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from Brassica napus and Arabidopsis thaliana. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 9-18.
- Achkar, J., Xian, M., Zhao, H., Frost, J.W., 2005.** Biosynthesis of phloroglucinol. *J. Am.Chem. Soc.* 127, 5332–5333.
- Adam A., Arabi M.I.E., Idris I. et Al-Shehadah E., 2017.** Select of several rhizobacteria strains on barley resistance against *Pyrenophora graminea* under □ field conditions. *Hellenic Plant Protection Journal* 10: 35-45,
- Agrios G. N., 2005.** Plant Pathology, Elsevier Academic Press. Department of PlantPathology., Univ. of Florida, USA, 635 p.
- Ahmad F., Ahmad I. et Khan M. S., 2008.** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.*, 163 (2) : 173-181.
- Ahemad M. et Kibret M., 2014.** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria : current perspective. *J. King Saud Univ. Sci.* 26 (1), 1–20.
- Ahn I. P., Lee S. W. et Suh S. C., 2007.** Rhizobacteria induced priming in Arabidopsis is dependent on ethylene, jasmonic acid and NPR1, 20 (7): 759-768.
- Albrecht-Gary A. M., Blanc S., Rochel N., Ocacktan A. Z. et Abdallah, M. A., 1994.** Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorganic Chemistry*, 33: 6391-6402.
- Alexander D. B. et Zuberer D. A., 1991.** Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils*, 12, 39-45.
- Almario J., Muller D., Défago G. et Moëgne-Loccoz Y., (2014).** Rhizosphere ecology and phytoprotection in soils naturally suppressive to Thielaviopsis black root rot of tobacco. *Environ. Microbiol.* 16, 1949–1960. 10.1111/1462-2920.12459
- Anjum A., Zuber M., Zia K.M., Noreen A., Anjum M.N. et Tabasum S., 2016.** Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements. *Int. J. Biol. Macromol.* 89, 161–174.
- Andersona A., Young Cheol K., 2018.** Biopesticides produced by plant-probiotic *Pseudomonas chlororaphis* isolates. *Crop Protection* 105 (2018) 62–69
- Ansari A.A., Gill S.S., Gill R.R., Lanza G. et Newman L., 2017:** Phytoremediation – management of environmental contaminants, vol. 5. Cham. Springer International Publishing, pp 469–486.

- Anthony U., Christophensen C., Neilse P. H., Gram L. et Petersen B. O., 1995.** Pseudomonine, an isoxazolidone with siderophoric activity from *Pseudomonas fluorescens* AH2 isolated from lake Victoria Nile perch. *J. Nat Prod.*, 58: 1786-1789.
- Anzai Y., Kim H., Park J.Y., Wakabayashi H., Oyaizu H., 2000.** Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1563–1589.
- Arnon D. I., 1949.** Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24: 1-15.
- Arima K., Imanaka H., Kousaka M., Fukuta A. et Tamura G., 1964.** Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.* 28 (8), 575–576.
- Arora N.K., Khare E. et Maheshwari D.K., 2011.** Plant growth promoting rhizobacteria: constraints in bioformulation, commercialization, and future strategies. In *Plant Growth and Health Promoting Bacteria. Microbiology Monographs* 18. Maheshwari, D.K. (ed). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 97–116.
- Arora N.K., Mehnaz S. et Balestrini R., 2016.** Bioformulations : for Sustainable Agriculture. Springer, India, pp. 299.
- Arthursa, S, Surendra K. Dara 2018** Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States *Journal of Invertebrate Pathology*, <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018>.
- Atwood, D., Paisley-Jones, C., 2017.** Pesticides industry sales and usage. 2008–2012 Market estimates. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC 20460. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage>.
- Audenaert K., Panery T., Cornelis P. et Hiiftc M., 2002.** Induction of systemic resistance *tu Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: rote of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 15, 1147-1156.
- Auling G., Busse H. J., Pilz F., Webb L., Kneifel H. et Claus D., 1991.** Rapid differentiation, by polyamine analysis, of *Xanthomonas* strains from phytopathogenic pseudomonads and other members of the class Proteobacteria interacting with plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41: 223-228.
- Azhar E.I., Papadiot, A., Bibi F., Ashshi A.M., Raoult D. et Angelakis, E., 2016.** '*Pseudomonas saudiphocaensis*' sp. nov., a new bacterial species isolated from currency notes collected during the Hajj pilgrimage in 2012 at Makkah, Saudi Arabia. *New Microbes New Infect.* 15, 131–133.
- Bagg A. et Neilands J. B., 1987.** Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol Rev.*, 51(4): 509-518.
- Bais H. P., Weir T. L., Perry L. G., Gilroy S. et Vivanco J. M., 2006.** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 233-66.

Baker K. et Cook R. J., 1974. Biological control of plant pathogens, Publisher: W.H. Freeman and Company., San Francisco , USA, ISBN : 0716705893, Record Number : 19741622425.

Bakker A. W. et Schippers B., 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp.-mediated plant growth-stimulation. *Soil. Biol. Biochem.*, 19 (4): 451-457.

Bakker P. A. H. M., Pieterse C. M. J. et van Loon L. C., 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97: 239-243.

Bardet L., Cimmino T., Buffet C., Michelle C., Rathored J., Tandina F., Lagier J.C., Khelaifia S., Abrahão J., Raoult D. et Rolain J.M., 2017. Microbial culturomics application for global health: noncontiguous finished genome sequence and description of *Pseudomonas massiliensis* Strain CB-1T sp. nov. in Brazil. *OMICS*. doi: 10.1089/omi.2017.0027.

Bashan Y., 1998. Inoculants of plant growth-promoting rhizobacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.*, 16: 729-770.

Battu P. R. et Reddy M. S., 2009. Isolation of secondary metabolites from *Pseudomonas fluorescens* and its characterization. *Asian J. Research Chem.*, 2 (1): 26-33.

Beckers G. J. M. et Conrath U., 2007. Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 425-431.

Benchabane M, Bakour R, Toua D. et Boutekrabt A., 2000. Mise en évidence de l'effet antagoniste de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate. *Bulletin OEPP/EPPO*, 30, 243-246.

Benchabane M., 2005. Caractérisation des effets d'antagonisme microbien et de promotion de la croissance végétale de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents. *Thèse Doctorat d'état*, FSB-USTHB, Alger, 235 p.

Benchabane M., Toua D. and Bakour R., 2013. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents phytobénéfiques Biocontrôle et phytostimulation. Presses Académiques Francophones 672p ISBN-10:3841620213 SBN-13:978-3-8416-2021-7

Bender C. L., Alarcon-Chaidez F. et Gross D. C., 1999. *Pseudomonas syringae* Phytotoxins: Mode of Action, Regulation, and Biosynthesis by Peptide and Polyketide Synthetases. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.*, 266-292.

Beneduzi A., Ambrosini A. et Passaglia L. M. P., 2012. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.*, 35(4): 1044-1051.

Berdy J., 2005. Bioactive Microbial Metabolites, *The Journal of Antibiotics*, 58, 1-26.

Berninger T., Gonz_alez Lopez O., Bejarano A., Preininger C. and Sessitsch A., 2017. Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants *Microbial Biotechnology* 0(0), 000–000 doi:10.1111/1751-7915.12880

- Berthelin, J., Leyval, C., Laheurte F. et De Guidici P., 1991.** Some consideration on the relation between phosphate solubilizing *Rhizobacteria* and their effect on seedlings and plants growth related to phosphorus mobilization., In: *Plant Growth-promoting Rhizobacteria – Progress and Prospects* (Keel C., Koller B., Defago G., Eds.), IOBC-WPRS Bull. XIV, pp. 359-364.
- Betina V., 1973.** Bioautography in paper and thin-layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *J. of Chromatography A*, 78(1): 41-51.
- Bisutti I.L. , Hirt K. & Stephan D.,2015.** Influence of different growth conditions on the survival and the efficacy of freeze-dried *Pseudomonas fluorescens* strain Pf153. *Biocontrol Science and Technology*, 25:11, 1269-1284.
- Blom D., Fabbri C., Connor E. C., Schiestl F. P., Klausser D. R., Boller T., Eberl L. et Weisskopf L., 2011.** Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environ. Microbiol.*, 13 (11): 3047-3058.
- Blumer C. et Haas D., 2000.** Iron regulation of the hcnABC genes encoding hydrogen cyanide synthase depends on the anaerobic regulator ANR rather than on the global activator GacA *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Microbiology*, 146, 2417-2424.
- BOISSON H. J. C. and GEIG J.P., 1994.** Variabilité du pouvoir pathogène chez le *Fusariumoxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytopath. medit.*, 1994, 33, 10-16
- Bora T., Ozaktan H., zaktan O., Gore E. and Aslan E., 2004 .**Biological Control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by Wettable Powder Formulations of the two Strains of *Pseudomonas putida* J. *Phytopathology*152, 471–475
- Bortolotti P., Hennart B., Thieffry C., Jausions G., Faure E., Grandjean T., Thepaut M., Dessen R., Allorge D, Guery B . P., Faure K., Kipnis E., Toussaint B. et Le Gouellec A., 2016.** Tryptophan catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and potential for inter-kingdom relationship. *BMC Microbiol.*, 16 (1): 137-146.
- Bosgelmez-Tiaz G., 2003.** Quorum sensing in Gram negative bacteria. *Turk. J. Biol.*, 27, 86-93.
- Bossis E., 1995.** Les *Pseudomonas* fluorescents de la rhizosphère : étude taxonomiques et effets sur la croissance de la tomate et du maïs, de la germination à la levée. *Thèse Doctorat*, Université de Nantes, France, 143 p.
- Bossis E., Lemanceau P., Latour X. et Gardan L. 2000.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*, 20 , 51-63.
- Boukerma L., 2012.** Effet des PGPR (*Pseudomonas* spp. fluorescents) sur le biocontrôle et l'induction de la résistance systémique (IRS) chez la tomate vis-à-vis de la fusariose vasculaire. *Thèse de Magister*, Univ. Saad Dahlab, Blida, Algérie, 140 p.
- Boukerma L., Benchabane M., Charif A. et Khélifi L., 2017.** Activity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs) in the Biocontrol of Tomato Fusarium Wilt. *Plant Protect. Sci.*, 53 (2):78-84.

Bounoua M. D., 2008. Essais d'utilisation des *Pseudomonas* spp et *Bacillus* spp. dans le Biocontrôle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* de la tomate et du *Verticillium dahliae* sur l'olivier. *Thèse de Doctorat*, Université d'Oran – Sénia, p.

Bric J. M., Bostock R. M. et Silverstone E. S., 1991. Rapid *in situ* assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl. and Env. Microbiol.*, 57 (2): 535-538.

Brodhagen M., Hankels M. D. et Loper J. E., 2004. Positive autoregulation and signaling properties of pyoluteorin, an antibiotic produced by the biological control organism *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, pp 1758-1766.

Browne P., Rice O., Miller H., Burcke J., Dowling D. N., Morrissey J. P. et O'Gara F., 2009. Superior inorganic phosphate solubilization is linked to phylogeny within the *Pseudomonosa Fluorescens* complex. *Applied Soil Ecology*, 43 (1): 131-138.

Beifuss U., Tietze M., 2005. Methanophenzine and other natural biologically active phenazines. *Top. Curr. Chem.* 244, 77–113.

Busquets A., Gomila M., Beiki F., Mulet M., Rahimian H., García-Valdés, E. et Laluca J., 2017. *Pseudomonas caspiana* sp. nov., a citrus pathogen in the *Pseudomonas syringae* phylogenetic group. *Syst. Appl. Microbiol.* 40:266–273.

Campos V.L., Valenzuela C., Yarza P., Kämpfer P., Vidal R., Zaror C., Mondaca M.A., López-López A. et Rosselló-Móra, R., 2010. *Pseudomonas arsenicoxydans* sp.nov., an arsenite-oxidizing strain isolated from the Atacama desert. *Syst. Appl. Microbiol.* 33, 193–197.

Cappuccino J. C. et Sherman N., 1992. *Microbiology: A laboratory manuel*, third ed. Benjamin/cummings. Pub. Co., New York, pp. 125-179.

Carcanague D. R., 1997. Novel derivatives of pseudomonic acid. *Bioorganic Medicinal Chem. Lett.*, 7 (21): 2805-2808.

Carlsen A. et Lecommandoux S., 2009. Self-assembly of polypeptide-based block copolymer amphiphiles. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 14 (5): 329-339.

Carrión V.J., Arrebola E., Cazorla F.M., Murillo J. et Vicente A., 2012. The *mbo* operon is specific and essential for biosynthesis of mangotoxin in *Pseudomonas syringae*. *PLOS ONE* 7, e36709.

Carvalho J.C., Vitolo M., Sato S. et Aquarone E., (2003). Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* grown in sugarcane blackstrap molasses through a fed-batch process: optimization by response surface methodology. *Appl Biochem Biotechnol* 110(3):151-64

Cattelan A. J., Hartel P. G. et Fuhrmann J. J., 1999. Screening for Plant Growth Promoting Rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 63: 1670-1680.

- Chao J., Wolfaardt G.M. et Arts M.T., 2010.** Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid profiles in biofilms and batch planktonic cultures. *Can. J. Microbiol.* 56, 1028–1039.
- Charde R. M., Charde M. S., Fulzele S. V., Satturwar P. M. et Joshi S. B., 2010.** Wound healing activity of ethanolic extract of *Rubia cordifolia* roots. *J. of Pharmacy Research*, 3 (12): 3061-3063.
- Chen B., Mei J., Kalman L., Shahangian S., Williams I., Gagnon M., Bosse D., Ragin A., Cuthbert C. et Zehnauer B., 2012.** Good laboratory practices for biochemical genetic testing and newborn screening for inherited metabolic disorders. *Morbidity and Mortality Weekly Report: Recommendations and Reports*, 61(2): 1-44.
- Chin-A-Woeng T. F. C., Bloemberg G. V. et Lugtenberg B. J. J., 2003.** Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phyto.*, 157, 503-523.
- Chin-A-Woeng T. F. C., Bloemberg G. V., Mulders I. H. M., Dekkers L. C. et Ben J. J. 2000.** Root colonization by Phenazine-1-Carboxamide producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL 1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol. Plant Microb. Interact.*, 13 1340-1345..
- Chincholkar S. et Thomashow L., 2014. Microbial Phenazines. Biosynthesis, Agriculture and Health. Springer Heidelberg New York Dordrecht London.**251p
- Chu H, Fierer N., Lauber C. L., Caporaso J. G., Knight R. et Grogan P., 2010.** Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environ. Microbiol.*, 12 (11): 2998-3006.
- Ciancio A., Pieterse C.M.J. et Mercado-Blanco J., 2016.** Editorial : harnessing useful rhizosphere microorganisms for pathogen and pest biocontrol. *Front. Microbiol.* 110(4):151-64.
- Cipriano M. A. P. and Freitas S.S., 2018.**Effect of *Pseudomonas putida* on chrysanthemum growth under greenhouse and field conditions. *African Journal of Agricultural.* pp. 302 310, 8
- Clifford J.C., Buchanan A., Vining O., Kidarsa T.A., Chang J.H., McPhail K.L. et Loper J.E., 2016.** Phloroglucinol functions as an intracellular and intercellular chemical messenger influencing gene expression in *Pseudomonas protegens*. *Environ. Microbiol.*
- Cohn, F., 1872.** Untersuchungen u"ber Bakterien. *Beitr. Biol. Pflanz.* 1, 127–224.
- Collins D.P. et Jacobsen B. J., 2003.** Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. *Biological Control.* 26 (2): 153-161.
- Colwell R. R. et Mandel M., 1964.** Adansonian analysis and deoxyribonucleic acid base composition of some Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 87: 1412-1422.
- Colwell R. R., Citarella R. V. et Ryman I., 1965.** Deoxyribonucleic acid base composition and Adansonian analysis of heterotrophic aerobic pseudomonads. *J. Bacteriol.*, 90: 1148-1149.

- Combes-Meynet E., Pothier J.F., Moëne-Loccoz Y. et Prigent-Combaret C., 2011.** The *Pseudomonas* secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *Azospirillum* genes involved in plant growth promotion. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24, 271-
- Commare R. R., Nandakumar R., Kandan A., Suresh S., Bharathi M., Raguchander T. et Samiyappan R., 2002.** *Pseudomonas fluorescens* based bioformulation for the management of sheath blight disease and leaf-folder insect in rice. *Crop Prot.*, 21: 671-677.
- Cook R. J., 2000.** Advances in plant health management in the twentieth century. *Annual Rev. of Phytopathol.* 38: 95-116.
- Corrêa E.B., Sutton J.C. et Bettiol W., 2015.** Formulation of *Pseudomonas chlororaphis* strains for improved shelf life. *Biological Control* 80 (2015) 50–55
- Costa E., Teixido N., Usall J., Atares E. et Vinas I., 2001.** Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 367-371.
- Costa E., Usall J., Teixidó N., Garcia N. et Viñas I., 2000.** Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze drying. *J. Appl. Microbiol.*, 89, 793-800.
- Costa R., Gomes N. C. M., Peixoto R. S., Rumjanek N., Berg G., Leda C. S., Mendonca-Hagler L. C. S. et Smalla K., 2006.** Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. associated to the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. *Soil Biol. Biochem.*, 38 (8): 2434-2447.
- Costa R., van Aarle I.M., Mendes R. et van Elsas J.D., 2009.** Genomics of pyrrolnitrin biosynthetic loci: evidence for conservation and whole-operon mobility within gram-negative bacteria. *Environ. Microbiol.* 11 (1), 159–175.
- Costa V.M., Amorim M.A., Quintanilha A. and Moradas-Ferreira P., 2002.** Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7. *Free Radic Biol Med* 33(11):1507-15
- Couillerot O., Prigent-Combaret C., Caballero-Mellado J. et Moenne-Loccoz Y., 2009.** *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 48 (5), 505-512.
- Coulibaly I., Amenan A. et Lognay G., 2009.** Survival of freeze-dried *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.*, 15 (2): 287-29.

- Coulibaly I., Dubois-Dauphin R., Destain J., Fauconnier M. L., Lognay G. et Thonart P., 2010.** The resistance to freeze-drying and to storage was determined as the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity. *Int. J. of Microbiol.*, 2010: 1-9.
- Cox C. D., Rinehart K. L., Moore M. L. et Cook J. C., 1981.** Pyochelin. novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*, Proc. Nath. Acad. Sci. USA 78, 4256-4260.
- Dagnelie P., 1975.** Theories et méthodes statistiques. Vol 2. Les méthodes de l'interférence statistique. Les presses agronomiques de Gembloux. 463 p.
- Dandurand L. M., Morra M. J., Chaverra M. H. et Orser C. S., 1994.** Survival of *Pseudomonas* spp. in air dried mineral powders. *Soil Biol. Biochem.*, 26: 1423-1430.
- Dastager S. G., Deepa C. K. et Petey A., 2011.** Potential plant growth-promoting activity of *Serratia nematophila* NII-0.928 on black papper (*Piper nigrum* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27 (2): 259-265.
- David B. V., Chandrasehar G. and Selvam P. N., 2018.** *Pseudomonas fluorescens*: a plant-growth-promoting rhizobacterium (pgpr) with potential role in biocontrol of pests of crops international institute of biotechnology and toxicology (iibat), Padappai, India
- De Coste N. J., Gadkar V. J. et Fillion M., 2010.** *Verticillium dahlia* alters *Pseudomonas* spp. populations and HCN gene expression in the rhizosphere of strawberry. *Can. J. of Microbiol.*, 56 (11): 906-915.
- De groot A., Filloux A. et Tommassen J., 1991.** Conservation of *xcp* genes, involved in the two-step protein secretion process, in different *Pseudomonas* species and other Gram-negative bacteria. *Mol. General. Genet.* 229: 278-284.
- Défago G. et Hass D., 1990.** *Pseudomonads* as antagonists of soil borne plant pathogens: Mode of actions and genetic analysis. *Soil Biochemistry*, 6, 249-291.
- Delaney S. M., Mavrodi D. V., Bonsall R. F. et Thomashow L. S., 2001.** *phzO*, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens*. *J. Bacteriol.* 183: 318-327.
- Delorme S., 2002.** Caractères bactériens associés à la compétitivité des *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la rhizosphère. Thèse Doctorat - Univeristé Bourgogne, France. 165 p.
- Demange P., Wendenbaum S., Bateman A., Dell A. et Abdallah M. A., 1987.** Structure and physiochemical properties of pyoverdins and related compounds. In: Iron transport in microbes, plants and animals, Weinheim : VCH. 167-187.
- Deshwal V. K., 2012.** *Pseudomonas aeruginosa* as biological control agent against plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Int. J. Plant Animal Env. Sci.*, 2 (1): 14-17.
- Digat B. et Gardan L., 1987.** Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fuorescens* et *Pseudomonas putida*. *Bulletin OEPP.*, 17, 559-568.

Digat B., 1992. Contrôle biologique et stimulation de la germination par la bactérisation. Défense des Végétaux. *Phytoma.*, 441, 34-38.

Doudoroff, M., et Palleroni N.J.,1974. Genus *Pseudomonas*. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edn. Buchanan, R.E., and Gibbons, W.E. (eds). Baltimore, MD, USA: Williams & Wilkins, pp. 217–243.

Drechsel H. et Winkelmann G., 1997. Iron chelation and siderophores. In: Transition Metals in Microbial Metabolism, Winkelmann, G. and Carrano, C.J. (eds) Amsterdam: Harwood Academic. pp.1-49.

Duijff B. J., Meijer J. W., Bakker P. A. H. M. et Schippers B., 1993. Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of fusarium wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Neth. J. Plant Pathol.*, **99**, 277-289.

Elad Y et Baker R. 1985a. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamyospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 75, 1053-1059.

Elad Y et Chet I., 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. *Phytopathology*, 77, 190-195.

Elad Y. et Baker R., 1985b. influence of trace amounts of cations and siderophore-producing *Pseudomonads* on Chlamyospore germination of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 75, 1047-1052.

El-Sayed A. K., Hothersall J. et Thomas C. M., 2001. Quorum-sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antibiotic mupirocin in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Microbiol.*, 147: 2127-2139.

Emmert E. A. B. et Handelsman J., 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol. Lett.*, 171: 1-9.

Escalante A.E., Caballero-Mellado J., Martínez-Aguilar L., Rodríguez-Verdugo, A. González-González A., Toribio-Jiménez J., et Souza V., 2009. *Pseudomonas cuatrocieneegasensis* sp. nov., isolated from an evaporating lagoon in the CuatroCienegas valley in Coahuila, Mexico. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1416–1420.

Farhan H. N., Abdullah B. H. et Hameed A. T., 2010. The biological activity of bacterial vaccine of *Pseudomonas putida* 2 and *Pseudomonas fluorescens*3 isolates to protect sesame crop (*Sesamum indicum*) from *Fusarium* fungi under field conditions. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1: 803-811.

Feng Z., Zhang J., Huang X., Zhang J., Chen M. et Li S., 2012. *Pseudomonas zeshuii* sp. nov., isolated from herbicide-contaminated soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 2608–2612.

Fenton A. M., Stephens P. M., Crowley J., O'Callaghan M. et Ogara F., 1992. Exploitation of gene(s) involved in 2,4-Diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. and Env. Microbiol.*, 58 (12): 3873-3878.

- Fernando W. G. D., Ramarathnam R., Krishnamoorthy A. S. et Savchuk S. C., 2005.** Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Bio. Biochem.*, 37: 955-964.
- Figueiredo M. V. B, Burity H. A, Martinez C. R et Chanway C. P., 2008.** Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) by co inoculation *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Applied Soil Ecol.*, 40: 182-188.
- Figueroa L. A. M., Cordero R. J. D., Martinez A. J. C., Meyer M. L., Lizarraga S. G. D., Gastelum R. F., Castro-Martinez C. et Maldonado-Mendoza I. E., 2016.** Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. *Springer Plus Journal*, 12 p.
- Figueroa L., Madrigal M.A., Yeriana K., Gámez.C. , Guadalupe R. , Beltrán A., Ivonne L. , Rubí N., Castro-Martínez C. et Maldonado-Mendoza E.I.,2017.** Induction Of *Bacillus Cereus* Chitinases As A Response To Lysates Of *Fusarium Verticillioides*. *Romanian Biotechnological Letters*. Vol. 22, No. 4,
- Fravel D. R., 1988.** Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annu. Rev. Phytopatho.*, 26, 75-91.
- Fravel D. R., Rhodes D. J. et Larkin, R. P., 1999.** Production and commercialization of biological control products. In: Albajes R., Gullino L. M., van Lenteren J. C., Elad Y. (Eds.), *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Fridlender M., Inbar J. et Chet. I., 1993.** Biological control of soil-borne plant pathogens by a b-1,3-glucanase–producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol. Biochem.*, 25: 1211-1221.
- Fuqua W. C., Winam S. C. et Greenberg E. P., 1994.** Quorum sensing in bacteria: The Lux R- Lux I family of cell density responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.*, 176, 269-275.
- Gao G., Yin D., Chen S., Xia F., Yang J. et Li Q., 2012.** Effect of biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2P24 on soil fungal community in cucumber rhizosphere using T-RFLP and DGGE. *PLoS ONE*, 7(2): e31806.
- Gao J., Xie, G. Peng et F.Xie Z., 2015.** *Pseudomonas donghuensis* sp. nov., exhibiting high-yields of siderophore. *Antonie van Leeuwenhoek* 107, 83–94.
- Garcia de Salamone I. E., Hynes R. K. et Nelson L. M., 2001.** Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.*, 47, 404-411.
- García-Valdés E. et Lalucat J., 2016.** *Pseudomonas*: Molecular phylogeny and current Taxonomy, in: Kahlon, R.S. (Ed.), *Pseudomonas: Molecular and Applied Biology*. Springer International Publishing, Switzerland, pp. 1–23.
- Gardan L. et Luisetti G., 1981.** Méthodes d'isolement et d'identification des bactéries phytopathogènes. INRA Angers, France. 32 p.

- Garrido-Sanz D., Meier-Kolthoff J.P., Göker M., Martín, M., Rivilla R., et Redondo-Nieto M., 2016.** Correction: Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex. *PLoS One* 11, e0150183.
- Gibello A., Vela A.I., Martín M., Mengs G., Alonso P.Z., Garbi C. et Fernández-Garayzábal J.F., 2011.** *Pseudomonas composti* sp. nov., isolated from compost samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2962–2966.
- Glick B. R., Penrose D. M. et Li J., 1998.** A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theor. Biol.*, 190: 63-68.
- Goldstein A. H., 1986.** Bacterial solubilization of mineral phosphates: Historical perspectives and future prospects. *Am. J. Alternate Agric.*, 1: 51-57.
- Gomila M., Peña A., Mulet M., Lalucat J. et García-Valdés E., 2015.** Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front. Microbiol.* 6.
- Gross H. et Loper J. E., 2009.** Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat Prod Rep.*, 26: 1408-1446.
- Gross M., 1990.** Factors of virulence of bacteria. In: *Methods in phytobacteriology* Ed., Klement Z., Rudolph K. and Sands D. C., Akademia Kiado, Budapest. 436-437.
- Gupta C. P., Dubey R. C. et Maheshwari D. K., 2002.** Plant growth enhancement and suppression of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut by fluorescent *Pseudomonas*. *Biol. Fert. Soil.*, 35: 399-405.
- Gupta G., Parihar S. S., Ahirwar N. K., Snehi S. K. et Singh V., 2015.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J Microb. Biochem. Technol.*, 7 (2): 96-102.
- Gupta R., Bisaria V. S. et Sharma S., 2016.** Response of rhizospheric bacterial communities of *Cajanus cajan* to application of bioinoculants and chemical fertilizers: A comparative study. *European J. of Soil Biol.*, 75, 107-114.
- Gurusiddaiah S., Weller D. M., Sarkar A. et Cook R. J., 1986.** Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* et *Pythium* spp. *Antimicrob Agents. Chemother.*, 29 (3): 488-495.
- Gutiérrez-García K., Neira-González A., Pérez-Gutiérrez R.M., Granados-Ramírez, G., Zarraga R., Wrobel K., Barona-Gómez F. et Flores-Cotera L.B., 2017.** Phylogenomics of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* and novel antiglycation endophytes from *Piper auritum*. *J. Nat. Prod.* 80, 1955–1963.
- Guttenberger N., Blankenfeldt W. et Breinbauer R., 2017.** Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products. *Biorg. Medic. Chem.*, 25 (22): 6149-6166.
- Haas D. et Défago G., 2005.** Biological Control of Soil-Borne Pathogens by Fluorescent *Pseudomonads*. *Nature Rev. Microbiol.*, 3(4): 307-319.

- Haas D. et Keel C., 2003.** Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 41: 117-153.
- Hameed A. T. et Farhan H. N., 2007.** Effect of *Pseudomonas aureofaciens* and *Pseudomonasputida* on growth of sorghum biocolor and protect them from infection of *Rhizoctonia solani* fungi. *Al-Anbar University, Journal for Pure Science*, 1: 8-16.
- Hammer P. E, Hill D. S., Lam S. T., Van Pée K. H. et Ligon J. M., 1997.** Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Appl Environ Microbiol*, 63, 2147-2154.
- Hariprasad P., Navya H. M., Chetranayaka S. et Niranjana S. R., 2009.** Advantage of using PSIRB over PSRB et IRB to improve plant health of tomato. *Biol. Control.*, 50 (3): 307-316.
- Hayat, R. Ali S. et Amara U., 2010** Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion:A review. *Ann. Microbiol.*, 60:579–598.
- He W.H., Wang Y.N., Du X., Zhou Y., Jia B., Bian J., Liu S.J. et Chen G.C., 2012.** *Pseudomonas linyingensis* sp. nov.: a novel bacterium isolated from wheat soils subjected to long-term herbicides application. *Curr. Microbiol.* 65, 595–600.
- Hernández-León R., Rojas-Solís D., Contreras-Pérez M., Orozco-Mosqueda M.C., Macías-Rodríguez L.I., la Cruz H.R., Valencia-Cantero E. et Santoyo G. 2015.** Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biol. Control* 81, 83–92.
- Hinsinger P., 2010.** Les racines au coeur du fonctionnement de la rhizosphère, Des connaissances pointues issues de la recherche aux applications possibles en AB (Montpellier SUPAGRO - CIRAD - INRA - IRD), *Alter agri: bimestriel des agricultures alternatives*. 101 :16-18.
- Hirota K., Yamahira K., Nakajima K., Nodasaka Y., Okuyama H. et Yumoto I., 2011.** *Pseudomonas toyotomiensis* sp. nov., a psychrotolerant facultative alkaliphile that utilizes hydrocarbons. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 1842–1848.
- Höfte M. et Altier N., 2010.** Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *ResMicrobiol.* 161(6):464-71.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T., 1994.** *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition.
- Howell C. R et Stipanovic R. D., 1980.** Suppression of *Pythium ultimum* induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology*, 70, 712-715.
- Hunter W.J., Manter D.K., 2011.** *Pseudomonas seleniipraecipitatus* sp. nov.: a selenite reducing γ -proteobacteria isolated from soil. *Curr. Microbiol.* 62, 565–569.
- Hunter, W.J., Manter, D.K., 2012.** *Pseudomonas kuykendallii* sp. nov.: a novel γ -proteobacteria isolated from a hexazinone degrading bioreactor. *Curr. Microbiol.* 65, 170–175.

- Hussein KH. A. and Joo J. H., 2017.** Stimulation, Purification, and Chemical Characterization of Siderophores Produced by the Rhizospheric Bacterial Strain *Pseudomonas putida Rhizosphere*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.05.006>
- Hwang C.Y., Zhang G.I., Kang S.H., Kim H.J. et Cho B.C., 2009.** *Pseudomonas pelagia* sp. nov., isolated from a culture of the Antarctic green alga *Pyramimonas gelidicola*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 3019–3024.
- Jackson A., McKenzie R. E., Fagerlund R. D., Kieper S. N., Fineran P. C. et Brouns S. J. (2017).** CRISPR-Cas : Adapting to change. *Science* 356. interactions. *Journal of Plant Growth Regulation.* 23: 211-222
- Jacob S., Sudini H. K. , 2016.** Indirect Plant Growth Promotion in Grain Legumes : Role of Actinobacteria. Chapter from book : Plant growth promoting actinobacteria : A new avenue for enhancing the productivity and soil fertility of grain legumes (pp.17-32)
- Janisiewicz, W.J., Buyer, J.S., 2010.** Culturable bacterial microflora associated with nectarine fruit and their potential for control of brown rot. *Can. J. Microbiol.* 56, 480–486.
- Jeyanthi V. and Kanimozhi S., 2018.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) – Prospective and Mechanisms: A Review *Journal of PurE and aPPLiEd Microbiology*, June 2018. Vol. 12(2), p. 733-749
- Jonsthor A. et Booth C., 1982.** Plant pathologist's pocket book. 2nded Common wealth. Mycological Institute. Kew Surrey. Englet, p. 439.
- Kałużna M., Willems A., Pothier J.F., Ruinelli M., Sobiczewski P. et Puławska J., 2016.** *Pseudomonas cerasi* sp. nov. (non Griffin, 1911) isolated from diseased tissue of cherry. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 370–377.
- Kanawapee N., Sanitchon J., Lontom W. et Threerakulpisut P., 2012.** Evaluation of salt tolerance at the seedling stage in rice genotypes by growth performance, ion accumulation, proline and chlorophyll content. *Plant Soil*, 358: 235-249.
- Keel C. et Défago G., 1991.** The fluorescent siderophore of *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO has no effect on the suppression of root diseases of wheat. pp 136-142 in: *Plant Growth- Promoting Rhizobacteria: Progress and Prospects.* C. Keel, B. Koller, and G. Défago, eds. *Int. Org. Biol. control Noxions Anim Plants/West Palaerctic Reg. Sec. Bull.*, 1418.
- Keel C., Schnider U., Maurhofer M., Voisard C., Laville J., Burger U., Wirthner P., Haas D. et Défago G., 1992.** Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, 5, 4-13.
- Keel C., Welter D. M., Natsch A., Defago G., Cook R. J. et Thomashow L. S., 1996.** Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Appl Environ Microbiol.*, 62, 552-563.

- Keel C., Wirthner P., Oberhansli T. H., Voisard C., Burger U., Haas D. et Defago G., 1990.** Pseudomonads as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: role of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. *Symbioses*, 9, 327-341.
- Kerstens K., Ludwig W., Vancanneyt M., Devos P., Gillis M. et Schleifer K. H., 1996.** Recent changes in the classification of pseudomonads: an overview. *Syst. Appl. Microbiol.*, 19: 465-477.
- Khan A. L., Waqas M., Kang S. M., Al-Harrasi A., Hussain J., Al-Rawahi A., Al-Khiziri S., Ullah I., Ali L., Jung H. Y. et Lee I. J., 2014.** Bacterial endophyte *Sphingomonas* ssp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *J. of Microbiol.*, 52: 689-695.
- Khan Md. S., Zaidi A. et Ahmad E., 2010.** Mechanism of Phosphate Solubilization and Physiological Functions of Phosphate-Solubilizing Microorganisms. DOI 10.1007/978-3-319-08216-5_2, © Springer International Publishing Switzerland.
- Khan S. R., Mavrodi D. V., Jog G. J., Suga H., Thomashow L. S. et Farrand S. K., 2005.** Activation of the *phz* operon of *Pseudomonas fluorescens* 2-79 requires the LuxR homolog PhzR, N-(3-OH-hexanoyl)-L-homoserine lactone produced by the LuxI homolog *phzI*, and a cis-acting *phz* box. *J. Bacteriol.*, 187: 6517-6527.
- Kim M. S., Kim, Y. C. et Cho B. H., 2004.** Gene expression analysis in cucumber leaves primed by root colonization with *Pseudomonas chlororaphis* O6 upon challenge inoculation with *Corynespora cassiicola*. *Plant Biology*, 6, 105-108.
- King E. O., Ward M. K. et Raney D. E., 1954.** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.*, 44, 301-307.
- Kiprianova E.A., Klochko, V.V., Zelena, L.B., Churkina, L.N., Avdeeva, L.V., 2011.** *Pseudomonas batumici* sp. nov., the antibiotic-producing bacteria isolated from soil of the Caucasus Black Sea coast. *Mikrobiol. Z.* 73, 3–8.
- Kirner S., Hammer P. E., Hill D. S., Altmann A., Fischer I., Weislo L. J., Lanahan M., van Pee K. H. et Ligon J. M., 1998.** Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.*, 180 (7): 1939-1943.
- Kishore G. K., Pande S. et Podile A. R., 2005.** Biological control of late leaf spot of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with chitinolytic bacteria. *Phytopathol.*, 95 (10): 1157-1165.
- Klaas Enno Stephan, Nikolaus Weiskopf, Peter M. Drysdale, Peter A. Robinson and Karl J. Friston 2007.** Comparing hemodynamic models with DCM. *Neuroimage*. Nov 15; 38(3-3): 387–401.
- Kloepper J. W. et Schroth M. N., 1978.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria on radishes, In: Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria. Angers, France, pp. 879-882.
- Kloepper J. W., Schroth M. N. et Miller T. D., 1980.** Effects of rhizosphere colonization by Plant Growth Promoting Rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, 70: 1078-1082.

- Kloepper J. W., Leong J., Teintze M. et Schroth M. N., 1980a.** Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature*, 286, 885-886.
- Kloepper J. W., Leong J., Teintze M. et Schroth M. N., 1980b.** *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils. *Curr Microbiol.*, 4,317-320.
- Kloepper J. W. et Schroth M. N., 1981.** Plant growth promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, 71, 642-664.
- Kosina M., Barták M., Mašláňová I., Pascutti A.V., Sedo O., Lexa M. et Sedláček I., 2013.** *Pseudomonas prosekii* sp. nov., a novel psychrotrophic bacterium from Antarctica. *Curr. Microbiol.* 67, 637–646.
- Kosina M., Švec P., Černohlávková J., Barták M., Snopková K., De Vos P. et Sedláček I., 2016.** Description of *Pseudomonas gregormendelii* sp. nov. On the role of soil bacteria in plant nutrition. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 7, 128-144.
- Krishramuthy K. and Grarananickam 1998.** Biological control by *Pseudomonas fluorescens* strain pf7–14: evaluation of a marker gene and formulations. *Biol. Control* 13 (3): 158–165.
- Kumar V. et Sharma N., 2017 .**Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Growth Promoters for Wheat: A Review *Agri Res & Tech: Open Access J* 12(4): ARTOAJ.MS.ID.555857.
- Lang E., Burghartz M., Spring S., Swiderski J. et Spröer C., 2010.** *Pseudomonas benzenivorans* sp. nov. and *Pseudomonas saponiphila* sp. nov., represented by xenobiotics degrading type strains. *Curr. Microbiol.* 60, 85–91.
- Latour X. et Lemanceau P., 1997.** Métabolisme carboné et énergétique des *Pseudomonas* spp. Fluorescents saprophytes à oxydase positive. *Agronomie.*, 17, 427-443.
- Latour X., Delorme S., Mirleau P. et Lemanceau P. 2003.** Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonads*: description of strategy based on population and model strain studies. *Agronomie*, 23, 397-405.
- Latour, X., Delorme, S., Mirleau, P. et Lemanceau, P., 2009.** Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescent pseudomonads: description of a strategy based on population and model strain studies. In: *Sustainable agriculture*. Part. 3, Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, D., Souchère, V. and Alberola, C. (Eds). Springer, Netherlands, pp. 285-296.
- Lee H., Damsz B., Woloshuk C. P., Bressan R. A., Narasimhan M. L., 2010.** Use of the plant defense protein osmotin to identify *Fusarium oxysporum* genes that control cell wall properties. *Eukaryot. Cell.*, 9 (4), 558-568.
- Leeman M., Van Pelt J. A., Den Ouden F. M., Heinsbroek M., Bakker P. A. H. M. et Schippers B., 1995.** Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to fusarium wilt, using a novel bioassay. *Eur. J. Plant Pathol.*, 101, 655-664.

- Lemanceau P., Alabouvette C. et Meyer J. M., 1986.** Production of fusarinine and iron assimilation by pathogenic and non-pathogenic *Fusarium*. In: Iron siderophores and plant diseases .TR Swinburne, ed. Plenum press, New York, 251-253.
- Lemanceau P., 1988.** Réceptivité des sols aux fusarioses vasculaires : étude critique des théories proposées. Thèse de doctorat, univ. Claude Bernard, Lyon, France, 99 p.
- Lemanceau P., 1992.** Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescents. *Agronomie*, 12, 413-437.
- Lemanceau P. et Alabouvette C., 1993.** Suppression of *Fusarium* wilts by fluorescent *Pseudomonads*: mechanism and applications. *Biocontrol Sciences and Technology*, 3, 219-234.
- Lemanceau, P., Pivato, B., Mougel, C., Avoscan, L., and Mazurier, S. 2014.** Diversité et activités microbiennes dans la rhizosphère: des atouts majeurs en agroécologie. *Alliances Au Pays Racines - 14e Colloq. Sci. Société Hortic. Fr.*
- Lepoivre P., 2003.** Phytopathologie : bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. 1ère édition, Ed. De Boeck Université. Bruxelles, p. 427.
- Li L., Abu Al-Soud W., Bergmark L., Riber L., Hansen L.H., Magid J. et Sørensen S.J., 2013.** Investigating the diversity of *Pseudomonas* spp. in soil using culture dependent and independent techniques. *Current Microbiology* 67, 423-430.
- Liffourrena, A.S. Lucchesi, G.I., 2018.** Alginate-perlite encapsulated *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) cells: preparation, characterization and potential use as plant inoculants. *J. Biotechnol.* 278, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.04.019>.
- Lim H. S., Kim Y. S. et Kim S. D., 1991.** *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (2): 510-516.
- Lin S.Y., Hameed A., Liu Y.C., Hsu Y.H., Lai W.A., Chen, W.M., Shen F.T., et Young C.C., 2013.** *Pseudomonas sagittaria* sp. nov., a siderophore-producing bacterium isolated from oil-contaminated soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 2410–2417.
- Liu M., Luo X., Zhang L., Dai, J., Wang Y., Tang Y., Li J., Sun T., et Fang C., 2009.** *Pseudomonas xinjiangensis* sp. nov., a moderately thermotolerant bacterium isolated from desert sand. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59, 1286-1289.
- Liu Y.C., Young L.S., Lin S.Y., Hameed A., Hsu Y.H. Lai W.A., Shen, F.T. et Young, C.C., 2013.** *Pseudomonas guguanensis* sp. nov. a gammaproteobacterium isolated from a hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 4591–4598.
- Liu Z., Wei H., Li Y., Li S., Luo Y., Zhang D. et Ni L., 2014.** Optimization of the spray drying of a *Paenibacillus polymyxa*-based biopesticide on pilot plant and production scales. *Biocontrol Science and Technology*, 24, 426–435.

Loboa C. B. , JuárezTomása M .S., Viruelb E. , Ferreroa M. A. et Luccaa M. E., 2019. Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiological Research* 219, 12–25

Lodish H., Berk A., Zipursky L.S., Matsudaira P., Baltimore D. and Darnell, J., 2000. *Molecular Cell Biology*, Freeman, W.H. and Co. New-york, pp. 1084.

Loper J. E. et Schroth M. N., 1986. Importance of siderophores in microbial interactions in the rhizosphere. In *Iron, Siderophores and Plant Diseases*. (Ed). Swinburne, T.R. Plenum Publishing Company., 85-88.

Loper J.E., Hassan K.A., Mavrodi D.V., Davis E.W., Lim C.K., Shaffer B.T., Elbourne L.D.H., Stockwell V.O., Hartney S.L., Breakwell K., Henkels M.D., Tetu S.G., Rangel L.I., Kidarsa T.A., Wilson N.L., van de Mortel J.E., Song C., Blumhagen R., Radune D., Hostetler J.B., Brinkac L.M., Durkin A.S., Kluepfel D.A., Wechter W.P., Anderson A.J., Kim Y.C., Pierson L.S., Pierson E.A., Lindow S.E., Kobayashi D.Y., Raaijmakers J.M., Weller D.M., Thomashow L.S., Allen, A.E. et Paulsen I.T., 2012. Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genet.* 8, e1002784.

Loper J.E., Hassan K.H., Davis E.W., Mavrodi D., Lim C. et Liam E., 2011. Genomic diversity of *Pseudomonas* spp. isolated from aerial or root surfaces of plants. *Pseudomonas 2011. 13th International Conference abstract book.* pp. 10.

López N.I., Pettinari M.J., Stackebrandt E., Tribelli P.M., Pötter M., Steinbüchel A. et Méndez B.S., 2009. *Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a Poly(3-hydroxybutyrate) producer isolated from an antarctic environment. *Curr. Microbiol.* 59, 514-519.

López J.R., Diéguez A.L., Doce A., De la Roca E., De la Herran R., Navas, J.I., Toranzo A.E. et Romalde J.L., 2012. *Pseudomonas baetica* sp. nov., a fish pathogen isolated from wedge sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 874-882.

Lugtenberg B. J. J., Kravchenko L. V. et Simons M., 1999. Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environ Microbiol.*, 1, 439-446.

Luís A.B. Novo Paula M.L., Castro Paula Alvarenga Eduardo F. et da Silva 2018. plant growth-promoting rhizobacteria-assisted phytoremediation of mine soils.

Malek F, 2015. Interaction microbienne cours assure aux Master II microbiologie et Magistère Maitrise de la qualité et du développement microbien. Université de Tlemcen. p. 17.

Manikandan R., Saravanakumar D., Rajendran L., Raguchander T. et Samiyappan R., 2010. Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against *Fusarium* wilt of tomato. *Biological Control*, 54: 83-89.

- Mansfeld-Giese, K., Larsen, J., Bødker, L., 2002.** Bacterial populations associated with mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41, 133–140.
- Marmur J., 1961.** Procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3, 208.
- Marmur J. et P. Doty. 1961.** Thermal renaturation of DNA. *J. Mol. Biol.* 3: 584–594.
- Martínez-Alvarez J. C., Castro-Martínez C., Sánchez-Pena P. R., Gutiérrez-Dorado I. et Maldonado-Mendoza E., 2016.** Development of a powder formulation based on *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 spores for biological control of *Fusarium verticillioides* in maize plants. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 32: 75.
- Mathivanan N., Prabavathy VR. and Vijayanandraj VR., 2005.** Application of talc formulations of *Pseudomonas fluorescens* migula and *Trichoderma viride* pers. Ex SF Gray decrease the sheath blight disease and enhance the plant growth and yield in rice. *J Phytopathol.* 153 : 697–701
- Mavrodi D. V., Blankenfeldt W. et Thomashow L. S., 2006.** Phenazine compounds in fluorescent pseudomonas spp. biosynthesis and regulation. *Annual rev. of phytopathol.*, 44, 417-445.
- Mavrodi D. V., Mavrodi O. V., Parejko J. A., Bonsall R. F., Kwak Y. S., Paulitz T. C., Thomashow L. S. et Weller D. M., 2012.** Accumulation of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid in the rhizosphere of dryland cereals. *Appl. and Env. Microbiol.*, 78, 804-812.
- Mazzola M., Cook R. J., Thomashow L. S., Weller D. M. et Pierson L. S., 1992.** Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 (8): 2616-2624.
- McKinney H. H., 1923.** Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, 26: 195-218.
- Mehta S. et Nautiyal C. S., 2001.** An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Curr. Microbiol.*, 43 (1): 51-56.
- Mercado-Blanco J., Van der Drift K. M. G. M., Olsson P. E., Thomas-Oates J. E., Van Loon L. C. et Bakker P. A. H. M., 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.
- Messiaen C. M., Blancard D., Rouxel F. et Lafon R., 1991.** Les maladies des plantes maraîchères 3^{ème} ed. INRA Paris, p. 552.
- Meyer J. M., Neely A., Stintzi A., Georges C. et Holder, J. A., 1996.** Pyoverdine is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, 64: 518-523.
- Meyer J. M. et Abdallah M. A., 1978.** The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification et physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.*, 107: 319-328.

- Meyer J. M., 2000.** Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch. Microbiol.*, 174: 135-142.
- Meyer J. M., Geoffroy V. A., Baida N., Gardan L., Izard D., Lemanceau P., Achouak W. et Palleroni N., 2002.** Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 2745-2753.
- Mezaache S., 2012.** Localisation des Déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la Rhizosphère de la pomme de terre. *Thèse Doctorat*, Université Ferhat Abbas, Sétif (Algérie)..221p
- Migula W., 1894.** Uber ein neues system de bakterien. *Arb Bakteriol Inst Karlsruhe*, 1: 235-238.
- Miller J. H., 1972.** Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Miraza M. S., Ahmed W., Latif F., Haurat J., Bally R., Normet P. et Malik K. A., 2001.** Isolation, partial characterization, et the effect of Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) on micro propagated sugarcane *in vitro*. *Plant Soil*, 237: 47-54.
- Mishra J. and Arora N K., 2017.** Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*
- Mishra M., Kumar U., Mishra P. K. et Prakas V., 2010.** Efficiency of Plant Growth Promoting Rhizobacteria for the enhancement of *Cicer arietinum* L. Growth and germination under salinity. *Adv. Bacterial. Research.*, 4 (2): 92-96.
- Mishra R. K., Bohra A, Kamaal N., Kumar K., Gandhi K., Sujayanand GK, P. R., Saabale, Satheesh Naik SJ, B. K. Sarma, D. Kumar, M. Mishra, D.K. Srivastava et N. P. Singh. 2018.** Utilization of biopesticides as sustainable solutions for management of pests in legume crops: achievements and prospects. *Journal of Biological Pest Control* (2018) 28:3 DOI 10.1186/s41938-017-0004-1
- Misko A. L. et Germida J. J., 2002.** Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42: 399-407.
- Morgan C. A., Herman N., White P. A. et Vesey G., 2006.** Preservation of microorganisms by drying. *J. Microbiol. Met.*, 66, 183-193.
- Morgan C. and Vesey G., 2009.** Freeze-Drying of Microorganisms. *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition). Reference Module in Biomedical Sciences. Pp : 162-173
- Mputu Kanyinda J-N., Pierart C., Weekers F., Delvigne F., Destain J. , Wathelet J. P et Thonart P., 2012.** Effects of glycerol on *Pseudomonas fluorescens* BTP1 freeze-dried. *Int. J. Biotechnol. Biochem.*, 8, 245-258.
- Mputu Kanyinda J-N. et Thonart P., 2013.** Optimisation of production, freeze-drying and storage of *Pseudomonas fluorescens* BTP1. *Int. J. Microbiol. Res.*, 5 (1): 370-373.

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). *Biotechnol. Agron Soc. Environ.*, 18 (1): 134-141.

Mputu Kanyinda J-N. et Tshimenga K. et Noki P., 2015. Accelerated oxidation test of freeze-dried *Pseudomonas fluorescens* BTP1, BB2 and PI9 strains. *The Asian J. of Appl. Microbiol.*, 2 (2): 18-26.

Mulet M., Lalucat J. et García-Valdés E., 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.*, 12 (6): 1513-1530.

Muller H. et Berg G., 2010. Impact of formulation procedures on the effect of the biocontrol agent *Serratia plymuthica* HERO-C48 on *Verticillium* wilt in oil seed rape Barreto Figueiredo et al. 2010 D. K. Maheshwari (ed.), Plant Growth and Health Promoting Bacteria. Microbiology Monographs 18, DOI 10.1007/978-3-642-13612-22, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Naik P. R. et Sakthivel N., 2006. Functional characterization of a novel hydro carbon clastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Res. Microbiol.*, 157: 538-546.

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

Naureen Z., Aqeel M., Hassan M.N., Gilani S.A., Bouqellah N. , Mabood F., Hussain J. , Fauzia Y. et Hafeez., 2015. Isolation and Screening of Silicate Bacteria from Various Habitats for Biological Control of Phytopathogenic Fungi. *American Journal of Plant Sciences*, 2015, 6, 2850-2859.

Neilands J. B., 1995. Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds, *J. Biol. chem.*, 270, 26723-26726.

Niamsup P., Sujaya N., Tanaka M., Sone T., Hanada S. Kamagata Y., Lumyong S. Assavanig A., Asano K., Tomita F. et Yokota A., 2003. *Lactobacillus thermotolerans* sp.nov., a novel thermo tolerant species isolated from chicken faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 263-268.

Niranjan R. S., Prasad S. N. et Sheakar S. H., 2004. Nove : Proline - An inducer of resistance against pearl millet downy mildew disease caused by *Sclerospora graminicola*. *Phytoparasitica.*, 32 (5): 523 527.

Novo L.A.B., Castro P.M.L., Alvarenga P. et da Silva E.F., 2018. CHAPTER 16 :Plant-Growth–Promoting–Rhizobacteria-assisted phytoremediation of mine soils

Nowak-Thompson B., Gould S. J. et Loper J. E., 1997. Identification and sequence analysis of the genes encoding a polyketide synthase required for pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Gene*, 204:17-24.

Nowak-Thompson B., Chaney N., Wing S., Gould S. I. et Loper J. E., 1999. Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.*, 181, 2166-2174.

O'sullivant D. J. et O'gara F., 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. and Mol. Biol. Review*, 56 (4): 662-676.

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

Ongena M., Jaques P., Delfosse P. et Thonart P., 2001. Unusual traits of the pyoverdinin-mediated iron acquisition system in *Pseudomonas putida* BTP1. *Biomaterials*, 15, 1-13.

Ongena M., Jacques P., Touré Y., Destain J., Jabrane A. et Thonart P., 2005. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69: 29-38.

Palleroni N. J., Ballard R. W., Ralston E. et Doudoroff M., 1972. Desoxyribonucleic acid homologies among some *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.*, 110, 1-11.

Palleroni N. J., 1984. Gram-negative aerobic rods and cocci : family I Pseudomonadaceae, 141-168. Krieg, Holt, William and Wilkins .Eds., In Bergey's manual of bacteriology, 1, William & Wilkins, Baltimore.

Palleroni N. J., 1992a. Introduction to the family *Pseudomonadaceae*, 3071-3085. A. Ballows, H. G. Trüper, M. Dworking, W. Harder and K. H. Schleifer .Eds., In The prokaryotes, Springer Verlag, New York.

Palleroni N. J., 1992b. Present situation of the taxonomy of aerobic *Pseudomonads*, 105-115. S. Galli, S. Silver and B. Witholt .Eds., In *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*, 60, American Society for Microbiology, Washington, DC.

Palleroni N.J., 2015. *Pseudomonas*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Inc. in association with Bergey's Manual Trust, pp.1-105. doi: 10.1002/9781118960608.gbm01210.

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

Palumbo J. D., Yuen G. Y., Jochum C. C., Tatum K. et Kobayashi D. Y., 2005. Mutagenesis of beta-1,3-glucanase genes in *Lysobacter enzymogenes* strain C3 results in reduced biological control activity toward *Bipolaris* leaf spot of tall fescue and *Pythium* damping-off of sugar beet. *Phytopathology*, 95: 701-707.

Pascual J., Lucena T., Ruvira M.A., Giordano A., Gambacorta A., Garay E., Arahall D.R., Pujalte M.J. et Macián M.C., 2012. *Pseudomonas litoralis* sp. nov., isolated from Mediterranean seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 438–444.

Patil S., Nikam M., Patil H., Anokhina T., Kochetkov V. and Chaudhari A ., 2017. Bioactive pigment production by *Pseudomonas* spp. MCC 3145: Statistical media optimization, biochemical characterization, fungicidal and DNA intercalation-based cytostatic activity. *Process Biochemistry*
<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.procbio.2017.05.003>

- Peix A., Ramírez-Bahena M. H. et Velázquez E., 2009.** Historical evolution and status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evolution*, **9**: 1132-1147.
- Peix A, Ramírez-Bahena M.H., Velázquez E., 2018.** The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infection, Genetics and Evolution* **57**, 106-116
- Persello-Cartieaux F., Nussaume L. et Robaglia C., 2003.** Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell and Environ.*, **26**: 189-199.
- Pierson L. S. et Thomashow L.S., 1992.** Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Mol Plant Microb Interact.*, **5**, 330-339.
- Pierson L. et Pierson E., 2010.** Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **86**: 1659-1670.
- Pieterse C. M. J et Van Loon L. C., 1999.** Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Sci.*, **4** (2): 52-58.
- Pieterse C. M. J., Zamioudis C., Berendsen R. L., Weller D. M., Van Wees S. C. M. et Bakker P. A. H. M., 2014.** Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, **52**: 347-75.
- Pozo M., L.VanLoon et e.Pieterse.2004.**Jasmonates-Signals in plant-microbe
- Pretty J. et Bharucha Z.P., 2015.** Integrated pest management for sustainable intensification of agriculture in Asia and Africa. *Insects* **6**, 152–182.
- Price-Whelan A., Dietrich L. E. et Newman D. K., 2006.** Rethinking secondary metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nat Chem Biol.*, **2**: 71-78.
- Raaijmakers J. M., Van der Sluis I., Koster M., Bakker P. A. H. M., Weisbeek P. J. et Schippers B. 1995a.** Utilization of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* spp. *Can. J. Microbiol.*, **41**, 126-135.
- Raaijmakers J. M., Van der Sluis I., Van den Hou, M., Bakker P. A. H. M. et Schippers B. 1995b.** Dispersal of wild-type and genetically-modified *Pseudomonas* spp from treated seeds or soil to aerial parts of radish plants. *Soil Biol. Biochem.*, **27**, 1473-1478.
- Raaijmakers J. M. et Weller D. M., 1998.** Natural plant protection by 2,4 diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. *Mol. Plant-Microbe Interac.*, **11**: 144-152.
- Raaijmakers J. M. ,Vlami M. et De Souza J. T., 2002.** Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek revue*, **81** (1-4): 537-547.
- Raaijmakers J.M., de Bruijn I. et de Kock M.J.D., 2006.** Cyclic lipopeptide production by plant associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**, 699-710.

- Rabhi N., 2012.** Isolement de *Pseudomonas* spp. fluorescents d'un sol salé. Effet d'osmoprotecteurs naturels. Mémoire de Magister, Univ. Ferhat Abbas Setif. 121p
- Rajappan K., Vidhyasekaran P., Sethuraman K. et Baskaran TL., 2002.** Development of powder and capsule formulations of *Pseudomonas fluorescens* strain Pf-1 for control of banana wilt. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. J Plant Dis Prot. 109 : 80–87.
- Ramamoorthy V., Viswanathan R., Raguchande T., Prakasam V. et Samiyappan R., 2001.** Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Prot.*, 20 (1): 1-11.
- Ramette A., Frapolli M., Défago G. et Moenne-Loccoz Y., 2003.** Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol *fluorescent pseudomonads* and its relationship with host plant species et HCN synthesis ability. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16 (6): 525-535.
- Ramette A., Frapolli M., Fischer-Le Saux M., Gruffac C., Meyer J. M., Défago G., Sutra L. et Moëgne-Loccoz Y., 2011.** *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl. Microbiol.*, 34: 180-188.
- Ramírez-Bahena M.H., Cuesta M.J., Flores-Féli, J.D., Mulas R., Rivas R., Castro-Pinto J., Brañas J., Mulas D., González-Andrés F., Velázquez E. et Peix A., 2014.** *Pseudomonas helmanticensis* sp. nov., isolated from forest soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 2338–2345.
- Ramon A., Mendoza García, Donald C. J., Kass, Gerben Martijn Ten Hoopen, Vera A. et Sánchez Garita., 2003.** Evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of *Rosellinia* root rot in cocoa . *Biological Control* 27(2):210-227
- Ramos E., Ramírez-Bahena M.H., Valverde A., Velázquez E., Zúñiga D., Rault A., Béal C., Ghorbal S., Ogier J. C. et Bouix M., 2007.** Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology*, 55, 35-43.
- Reddy M. S., 1992.** Biological control of plant diseases ESSO Ag biologicals, 402-415. Innovation Blvd. Saskatoon, Saskatchewan S7N 2x2.
- Renwick A., Campbell R. et Coe S., 1991.** Assessment of *in vivo* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathol.*, 40: 523-532.
- Rijavec T. et Lapanje A., 2017.** Cyanogenic *Pseudomonas* spp. strains are concentrated in the rhizosphere of alpine pioneer plants. *Microbiol. Res.* 194, 20–28.
- Rodelas B., Salmeron V., Martinez-Toledo M. V. et Loper G. J., 1993.** Production of vitamins by *Azospirillum brasilense* in chemically defined media. *Plant Soil*, 153, 97-101.
- Rodríguez H. et Fraga R., 1999.** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.*, 17 (4-5): 319-339.

Russell N.J., 1989. Adaptive Modifications in Membranes of Halotolerant. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, Vol. 21, No. 1, 1989.

Russell N.J., Evans R.I Tersteeg P.F., Hellemons J., Verheul. and Abee A.,1995. Membranes as a target for stress adaptation International Journal of Food Microbiology Volume 28, Issue 2, December 1995, Pages 255-261

Russell P., Benson J.D. et Denis C.L., 2002. Characterization of mutations in NOT2 indicates that it plays an important role in maintaining the integrity of the CCR4-NOT complex. *J Mol Biol* 322(1):27-39.

Saharan B. S. et Nehra V., 2011. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*. A Critical Review. *Life Sci. and Med. Res.*, 2011: LSMR-21, 1-30.

Sahu P. K., Gupta A., Singh M., Mehrotra P. et Brahma Prakash G. P., 2018. Bioformulation and fluid bed drying: A new approach towards an improved biofertilizer formulation. Eco-friendly Agro-biological Techniques for Enhancing Crop Productivity. pp 47-62

Saikia R., Singha T., Kumara R., Srivastava J., Srivastava A. K., Singh K. et Arora D. K., 2003. Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri* in chickpea. *Microbiological Research*, 158, 3, 203-213.

Sallam N. A., Riad S. N., Mohamed, M. S. et Seef El-eslam A., 2013. Formulations of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas fluorescens* for biocontrol of cantaloupe root rot caused by *Fusarium solani*. *J. of Plant Prot. Res.*, 53 (3): 295-300.

Sandhya V., Ali S.k. Z., Venkateswarlu B., Reddy G. and Grover M., 2010. Effect of osmotic stress on plant growth promoting *Pseudomonas* spp. *Arch Microbiol* 192:867–876.

Sandhya V., Ali S.K.Z., Minakshi G., Reddy G. and Venkateswarlu B., 2009. Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP- P45. *Biol Fertil Soils* 46:17–26.

Santivarangkna C., Kulozik U. et Foerst P., 2008. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Appl Microbiol.* 105 (1):1-13.

Schildkraut C., Doty P., Marmur J., 1961. Formation of hybrid DNA molecules and their use in studies of DNA homologies. *J. Mol. Biol.* 3, 595.

Schroth M. N., Hildebrand D. C. et Panopoulos N., 1992. Phytopathogenic *Pseudomonads* and related plant-associated *Pseudomonads*, 3104-3131. Balows .Eds., In *The Prokaryotes*, Springer Verlag.

Schwyn B. et Neilands J. B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem.*, 160, 47-56.

Seema K., Mehta K. et Singh N., 2018. Studies on the effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on growth, physiological parameters, yield and fruit quality of strawberry cv. Chandler. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 7, 383–387.

See-Too W.S., Salazar S., Eea R., Convey P., Chan K.G. et Peix A., 2017. *Pseudomonas versuta* sp. nov., isolated from Antarctic soil. Syst. Appl. Microbiol. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.03.002>.

Selvaraj S., Ganeshamoorthi P., Anand T., Raguchander T., Seenivasan N. and Samiyappan R., 2014. Evaluation of a liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* and *Helicotylenchus multincinctus* in banana plantation. *Biocontrol*, 59, 345–355.

Senthil N., Raguchander T., Viswanathan R. and Samiyappan R., 2003. Talc formulated fluorescent *pseudomonads* for sugarcane red rot suppression and enhanced yield under field conditions. *Sugar Tech.* 5 : 37–43

Shafiei R., Delvigne F. et Thonart. P., 2013. Flow-cytometric assessment of damages to *Acetobacter senegalensis* during freeze-drying process and storage. *Acetic Acid Bacteria*; volume 2(s1): e10: 62-70.

Shahzad, S., Khan, M.Y., Zahir, Z.A., Asghar, H.N., Chaudhry, U.K., 2017. Comparative effectiveness of different carriers to improve the efficacy of bacterial consortium for enhancing wheat production under salt affected field conditions. *Pak. J. Bot.* 49,1523–1530

Sharifi-Noori M. S., Saud H. M. et Azizi E., 2015. Evaluation of plant growth promoting Rhizobacteria as biocontrol agents for the control of blast disease in rice. *J. of Agri. Sci. and Eng.*, 1 (3): 135-142.

Sharma A. et Johri B. N., 2003. Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS₉ in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. *Microbiol. Res.*, 158 (3): 243-8.

Shishkoff et McGrath 2002. AQ10 Biofungicide Combined with Chemical Fungicides or AddQ Spray Adjuvant for Control of Cucurbit Powdery Mildew in Detached Leaf Culture. *Plant Disease.* 86(8):915-918 .

Siddiqui Z. A., Baghel G. et Akhtarn M. S., 2007. Biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Rhizobium* and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on lentil. *World. J. of Microbiol. and Biotechnol.*, 23: 435-441.

Sivasakthi S., Usharani G. et Saranraj P., 2014. Biocontrol potentiality of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African J. of Agri. Res.*, 9 (16): 1265-1277.

Smibert R. M. et 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.

Sonnleitner E. et Haas D., 2011. Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91 (1): 63-79.

Spadaro et Gullino, 2005 . Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens *Crop Protection* 24(7):601-613.

- Stanier R. Y., Palleroni N. J. et Doudoroff M., 1966.** The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *Microbiol.*, 43 (2): 159-271.
- Stephan D., Da Silva A. P. M., et Bisutti I. L., 2016.** Optimization of a freeze-drying process for the biocontrol agent *Pseudomonas* spp. and its influence on viability, storability and efficacy. *Biological Control*, 94: 74-81.
- Stevenson F. J. et Cole M. A., 1999.** The phosphorus cycle. In: *Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients*. John Wiley and Sons., pp. 279-329.
- Sundara B., Natarajan V. et Hari K., 2002.** Influence of phosphorous solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorous and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Res.*, 77: 43-49.
- Suty L., 2010.** La lutte biologique : vers de nouveaux équilibres écologiques. Collection : Sciences en partage. Editions Quae. Versailles, France 328 p.
- Taguet F., Boisset C., Heyraud A., Buon L. et Kaci Y., 2015.** Characterization and structure of the polysaccharide produced by *Pseudomonas fluorescens* strain TF7 isolated from an arid region of Algeria. *C. R. Biologies*, 338: 335-342.
- Taraz K., Tappe R. et Schröder H., 1991.** Ferribactins the biogenetic precursors of pyoverdins. *Z naturforsch*, 46C, 527-533.
- Thomashow L. S. et Weller D. M., 1988.** Role of a phenazineantibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis var tritici*. *J. Am. Soc. Microbiol.*, 170, 3499-3508.
- Thomashow L. S. et Weller D. M., 1990.** Role of antibiotics et siderophores in biocontrol of take-all disease of wheat. *Plant et Soil.*, 129, 93-99.
- Thomashow L. S., Weller D. M., Bonsall R. F. et Pierson L. S., 1990.** Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microb.*, 56, 908-912.
- Thomashow L. S., 1996.** Biological control of plant root pathogens. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7, 343-347.
- Thomashow L. S. et Weller D. M., 1996.** Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In: *Plant-microbe interactions*, vol. 1. G. Stacey and N. T. Keen (ed.), Chapman and Hall, London, United Kingdom, 187-236.
- Tindall B.J., Rosselló-Móra R., Busse H.J., Ludwig W. et Kämpfe P., 2010.** Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 249–266.
- Ton-That H., Liu G., Mazmanian S. K., Faull K. F. et Schneewind O., 1999.** Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif, *PNAS*, 96 (22): 12424-12429.

- Toua D., Benchabane M., Bensaid F. et Bakour R., 2013.** Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of fusarium wilt in tomato and flax. *African J. of Microbiol. Res.*, 7 (48): 5449-5458.
- Trapet P., Avoscan L., Klinguer A., Pateyron S., Citerne S., Chervin C., Mazurier S., Lemanceau P., Wendehenne D. N. et Besson-Bard A., 2016.** The *Pseudomonas fluorescens* Siderophore Pyoverdine Weakens *Arabidopsis thaliana* Defense in Favor of Growth in Iron-Deficient Conditions. *Plant Physiol.*, 171, 675-693.
- Turner J. M. et Messenger A. J., 1986.** Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. *Adv. Microb. Physiol.*, 27, 211-275.
- Tuzun , 2001.** Upadhyay Anamika, Mandira K, Upadhyay A., Soumya T, Rajam Manchikatla Venkat, Srivastava Sheela. Small RNAs regulate the biocontrol property of fluorescent *Pseudomonas* strain Psd. *Microbiological Research*. 196, 80-88.
- Vacheron, 2015.** Sélection des rhizobactéries phyto-stimulatrices par la plante : impact sur la distribution des propriétés phytobénéfiques chez les *Pseudomonas fluorescens*. These de doctorat l'université Claude Bernard Lyon 1. 271p
- Van Loon L. C., 1998.** Biotechnology as a means to improve biological control of plant diseases. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* 63, 1657-1666.
- Van Loon L. C. et Glick B. R., 2004.** Increased Plant Fitness by Rhizobacteria. *Mol. Ecotoxicol. of Plants*, 170, 177-205.
- Van Loon L. C., 2007.** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol*. 119:243–254
- Vancanneyt U., Torck D., Dewettinck M., Vaerewijck M.J. et Kersters K., 1996.** Grouping of pseudomonads by SDS-PAGE of whole-cell proteins. *Syst. Appl. Microbiol.* 19, 556–568.
- Velezmoro C. et Peix A., 2013.** *Pseudomonas punonensis* sp. nov., isolated from straw. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 1834-1839.
- Ventura M., Elli M., Reniero R. et Zink R., 2001.** Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Ecology.*, 36: 113-121.
- Verma S. C., Ladha J. K. et Tripathi A. K., 2001.** Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.*, 91 (2-3): 127-141.
- Verma M., Brar S. K., Tyagi R. D., Surampalli R. Y. et Valero J. R., 2007.** Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of Biological Control. *Biochem. Eng. J.*, 37 (1): 1-20.
- Vidhyasekaran R., Rabindran R., Muthamilan M., Nayar K., Rajappan K., Subramanian N. et Vasumathi K. 1997.** Development of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control pigeonpea wilt. *Biol. Control.*, 8, 166-171.

- Vincent M. N., Harrison L. A., Brackin J. M., Kovacevich P. A., Mukerji P. et Weller D. M., 1991.** Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 57: 2928-2934.
- Vinoth R. S., Kanikkay R. A., Tyagi M. G., Shah N. H., Amala J. J. A., Infant S. B. et Sathiyaseelan K., 2009.** Study of starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the production of amylase by using paddy straw. *Recent Res. in Sci. and Tech.*, 1 (1): 008-013.
- Voisard C., Keel C., Haas D. et Défago G., 1989.** Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J.*, 8 (2): 351-358.
- Waksman S. A., 1945.** Microbiological antagonism and antibiotic substances. The Commonwealth Fund., New York, USA.
- Walsh U., Morrissey J. P., O'Gara F., 2001.** *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 289-295.
- Wang Y.N., He W.H., He H., Du X., Jia B., Zeng Z.P., An M.L. et Chen, G.C., 2012.** *Pseudomonas nitritireducens* sp. nov., a nitrite reduction bacterium isolated from wheat soil. *Arch. Microbiol.* 194, 809–813.
- Weller D. M., 1988.** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Rev. of Phytopathol.*, 26: 379-407.
- Weller D. M., Raaijmakers J. M., McSpadden Gardener R. B. et Thomashow L. S., 2002.** Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 40, 309-348.
- Weller D. M., Van Pelt J. A., Mavrodi D. V., Pieterse C. M. J., Bakker P. A. H. M, et Van Loon L. C., 2004.** Induced systemic resistance (ICR) in *Arabidopsis* against *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* by 2,4-diacetylphloroglucinol (PAPG)-producing *Pseudomonas fluorescens*. (Abstr.) *Phytopathology*, 94, S108.
- Weller D. M., 2007.** *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. Symposium : The nature and application of biocontrol microbes III: *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97: 250-256.
- Whipps J. M., 1997.** Ecological considerations involved in commercial development of biological control agents for soil-borne diseases. In: Van Elsas JD, Trevors JT, Wellington EMH (eds.) *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York, USA, pp. 525-545.
- Whipps J., 2001.** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.*, 52: 487-511.
- Williston E. H., Zia-Walrath P. et Youmans G. P., 1947.** Plate methods for testing antibiotic activity of actinomycetes against virulent human type Tubercle Bacilli. *J. Bacteriol.*, 54 (5): 563-568.
- Wink, J., Kroppenstedt, R.M., Seibert, G., Stackebrandt, E., 2003.** *Actinomadura namibiensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 721–724.

Wiyono S., Schulz D.F. and Wolf G.A. 2008. Improvement of the formulation and antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* B5 through selective additives in the pelleting process. *Biol. Control* 46 (4): 348–357.

Woese C. R., Stackebrandt E., Weisburg W. G., Paster B. J., Madigan M. T., Fowler V. J., Hahn C. M., Blanz P., Gupta R., Nealson K. H. et Fox G. E., 1984. The phylogeny of purple bacteria: The alpha subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.*, 5: 315-326.

Wolfe J. et Bryant G., 1999. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology*.;39(2):103-29

Wong, B.T., Lee, D.J., 2014. *Pseudomonas yangmingensis* sp. nov., an alkaliphilic denitrifying species isolated from a hot spring. *J. Biosci. Bioeng.* 117: 71–74.

Wood D. W., Gong F., Daykin M. M., Williams P. et Pierson L. S., 1997. N-acyl-homoserine lactonemediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *J. Bacteriol.*, 179, 7663-7670.

Xiao Y.P., Hui W., Wang Q., Roh S.W., Shi X.Q., Shi J.H., Quan Z.X., 2009. *Pseudomonas caeni* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from the sludge of an anaerobic ammonium-oxidizing bioreactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2594-2598.

Xin Y.H., Zhang D.C., Liu H.C., Zhou H.L. et Zhou Y.G., 2009. *Pseudomonas tuomuensis* sp. nov., isolated from a bird's nest. *J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 139–143.

Yao A. A. Coulibaly I., Lognay G., Fauconnier M. L. et Thonart P., 2008. Impact of polyunsaturated fatty acid degradation on survival and acidification activity of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11 during storage. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 79: 1045-1052.

Yoo S.K., Chung K.S., Kim J., Lee J.H., Hong S.M., Yoo S.J., Yoo S.Y., Lee J.S., et Ahn J.H., 2005. Constans activates suppressor of overexpression of constans 1 through flowering locus T to promote flowering in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139(2):770-8.

Zhang D.C., Liu H.C., Zhou Y.G., Schinner F. et Margesin, R., 2011. *Pseudomonas bauzanensis* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2333-2337.

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

Zhou L., Jiang H., Jin K., Sun S., Zhang W., Zhang X. et He Y.W., 2015. Isolation, identification and characterization of rice rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA1201 producing high level of biopesticide “Shenqinmycin” and phenazine-1-carboxamide. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 55 (4), 401–411.

Zohar-Perez A., Nussinovitch and Ilan C., 2003. Mutual relationships between soils and biological carrier systems *Biotechnology and Bioengineering* 92(1):54-60.

Zurdo-Pineiro J.L., Rivas R., Trujillo M.E., Vizcaino N., Carrasco J.A., Chamber, M., Palomares A., Mateos P.F., Martı́nez-Molina E. et Velá zquez E., 2007. *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 784–788.

ANNEXES

MILIEUX DE CULTURE

Milieu B de King (KB) (King <i>et al.</i> , 1954)		Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Jonsthon et Booth, 1983)	
Peptone (Difco)	20 g	Pomme de terre	200 g
Glycerole (Prolabo)	15 ml	Dextrose	20 g
K ₂ HPO ₄ (Sigma)	1,5 g	Agar	15 g
MgSO ₄ (Sigma)	1,5 g	Eau distillée	1000 ml
Agar (Sigma)	15 g	pH 7 autoclavage 20 minutes	à 120° C
Eau distillée	1000 ml		
pH = 7,2 autoclavage 20 minutes	à 120° C		
Milieu gélatine (Lelliot et Stead, 1987)		Milieu Levane (Hildebrand <i>et al.</i>, 1988)	
Extrait de levure	3 g	Extrait de levure	2 g
Peptone	5 g	Bactopeptone	5 g
Gélatine	120 g	NaCl	5 g
Eau distillée	1000 ml	Saccharose	50 g
pH = 7 autoclavage 20 minutes	à 120° C	Agar	15 g
		Eau distillée	1000 ml
		pH 7,2 autoclavage 20 minutes	à 120° C
Milieu LB (Gardan et Luisetti, 1981)		NBY à 2% de glucose	
Bactotryptone	10g	Bouillon nutritif (Difco)	8
Extrait de levure	5 g	Extrait de levure (Difco)	2
NaCl	5 g	K ₂ HPO ₄	2
Agar	15 g	KH ₂ PO ₄	0.5
Eau distillée	1000 ml	Glucose	2
pH = 7 autoclavage 20 minutes	à 120° C	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25
Milieu de Pikovskaia (Pikovskaya, 1948) (solubilisation des phosphates)		Milieu pour les enzymes protéolytiques	
Sucrose	10	CAA	5
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5	Extrait de levure	2,5
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	5	glucose	1
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,25	Agar	15
KCl	0,2	Solution de lait écrémé	1000 ml (7%)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1		
BPB	0,25		
Milieu pour production d'AIA		Milieu pour production d'HCN	
LB à 5 mm de tryptophane et 0,06% de SDS		TSA ou TSB à 4,4 g de glycine	
Milieu pour réduction des nitrates		Milieu ISP2 (INTERNATIONAL STREPTOMYCES PROJECT) (SHRIRLING et GOTTIEB, 1966)	
Bouillon nutritif à 0,2 % de KNO ₃		Extrait de levure	4 g
		Extrait de malt	10 g
		glucose	4 g
		Agar	15 g
		Eau distillée	1000 ml

II.1 Alignement del'ADNr 16 S des isolas de *Pseudomonas*

1- IDENTIFICATION1014041(F8)

>F8

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTCAGC
GGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAAT
ACCGCATAACGTCTACGGGAGAAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGA
TTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCA
CACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAA
GCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAG
GGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTTGGTTGT
TAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCAAGCTAGAGTACGGTA
GAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG
ACCACCTGGACTGATACTGACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTT

2- IDENTIFICATION1014042(F19)

>F19

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTCAGC
GGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGRACGCTAAT
ACCGCATAACGTCTACGGGAGAAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGA
TTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCA
CACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAA
GCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAG
GGCAGTAAGYTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTTGGTTGT
TAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCAAGCTAGAGTACGGTA
GAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG
ACCACCTGGACTGATACTGACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTG

3- IDENTIFICATION1014043(F20)

>F20

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGC
GGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGAAACGGACGCTAAT
ACCGCATAACGTCTACGGGAGAAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGA
TTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCA
CACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAA
GCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAG
GGCAGTAAATTAATACTTTGCTGTTTTGACGTTACCGAMAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTTGGTTAGT
TAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAAAACCTGACTGACTAGAGTATGGTA
GAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG
ACCACCTGGACTGATACTGACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTG

4- IDENTIFICATION1014044(F23)

>F23

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGC
GGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGAAACGGACGCTAAT
ACCGCATAACGTCTACGGGAGAAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGA
TTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCA
CACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAA
GCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAG
GGCAGTAAATTAATACTTTGCTGTTTTGACGTTACCGAMAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTTGGTTAGT
TCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTG

TTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCA
 CACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAA
 GCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAG
 GGCAGTAAAGCTAATACTTGTCTTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCA
 GCCGCGTAATACAGAGGGTGAAGCGTAAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTCGT
 TAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTACGGTA
 GAGGGTGGTGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG
 ACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
 TCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTG

9- IDENTIFICATION1014054(BT7)

>BT7

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTTGGAGAGC
 GGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTCCGAAACGGACGCTAAT
 ACCGCATACGCTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGA
 TTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCA
 CACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAA
 GCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAG
 GGCAGTAAATTAATACTTTGTCTTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCA
 GCCGCGTAATACAGAGGGTGAAGCGTAAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTAGT
 TAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAAAGTACTGACTAGAGTATGGTA
 GAGGGTGGTGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG
 ACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
 TCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGG

10- IDENTIFICATION(F21)

>F21

CAAGAATATTTCTAATGGGGTGAACCCCCCTTTCACCTGGATTTGTGAACCGGCCGGTGCGGGGGAGACAAAA
 GACCCGGGGGGAAAAGCAATTCCTTTCGCGTGGCCGTTTTAAGTACTGGGGAACTAATAGGAAGGCAAACCCG
 GTTCCCCAACGGTGTGTACGCGAGGGTGGGAGGAAGGACCTGGGGAAAGGATTAAGAGGGGGGCATTTTGATT
 GGGGATTACTAGGATTCCCGACTTCACGCACTGGAGTGGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGGGA
 TTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGACGTAAGGGCCAT
 GATGACGTTCCGTCATCCCCACCTTCCTAACGGTTTTGTCACCCCGGGCAGTCTCCCTTAGAGTGCCCCACCATAAC
 CGTGGTGGTAACTAAGGACAAGGGTTCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAAACATCTCACGACACGAGCTGACG
 ACAGCCATGCAGCACCTGGTCTCAATGTTCGGAAGGCACCAATCTATCTTAGAAAAGTTTATTGGATGTCAAG
 GCCGAAAGGTTCTTCGCGTGGTTTTGCAATAAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTG
 AGTTTTAACCTTGGCGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTCAAAGCTC
 CCAACGGCTAGTTGGCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCACCACGCTTTTCGCAC
 TTCAGTGCAGTTCAGTCGAGGGTGGTGAACAATACCACCGGGGGGCTGCCCTTCCCATAGGGGATGTCAACCTAC
 CGCTAAAAAATTACGCCACCTCACCGATAAACTAAGTGGATCAATTTTTTAAACCACCCGGTCTTGGACGCGCC
 GGGGTGAGCCATGGCCAAATTTATTAACACCCCTT

11- IDENTIFICATION (BB9)

>BB9

CTAACACATTGGCCAATTTCCGAAGCCGAATTAACCCGGGGAGCCTTTGGCTCCCTTGGAAATCCAGGCNNGCGG
 GGGCCGGGTGGAGTAAAAACCCCCCGCGAAATTTCCCCCGGGTAAATTGGGGGGGAAAAACCCCTTTTTGAAA
 AGGAACGCCCAACCCCCCAATACGTCCTTTGGGGAAGAAAGCAGAGGGACCTTTCTGGGCCCTTGCCGTTTCG
 GATGACCCTAGGGTCGTATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCGTAACTGTTCTGAG
 AGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACA
 ATGGACGAAAGCCTGATCCAGCCCATGCCGCTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCCCTTTAAGTTGGG
 AGGAAGGGCAGTAAGTAATACCTTGTCTTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCA
 GCCGCGTAATACAGAGGGTGAAGCGTAAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAG
 TTGGATGTGAAAGCCTCGGGCTCAACCTAGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTACGGNANAGAGGA
 KGGTGGAAATTTCCYTGTGTAGNCGGTGNAATGCGTARATATAGGAAGGAACACCANGTGGCGAAGGCGACCAC
 CTGGACTGATACTGACATNTNGAGGTGMGAAAGCSTGGGGWAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTATTCCTTC
 GCCGTAACGATGTACAAGTACCGTTNNGAATCTTTGCAGANTTTTGTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGAC
 CGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTG
 GTTTAATTCAAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATGCRGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGC

TTCGGGAACCTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAAC
 GAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG
 GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGGTACA
 GAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCTGATCGCAGTCTGCAACTCGAC
 TGCGTGAAGTCGGAATCGCTGGTAATCGCAAATCAGAATGTGCGCGGTGAATACCTTCCCAGGCTTGTACACACC
 GCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTNACCYTTCCGGGGGACGGTTACCACGGGT
 GTGATTCATGACTGGGGGTGAAAGTCGTAACAAGGGTACCCCTTTAAAAA

12- IDENTIFICATION (GP4)

>GP4

GGGTTTGGCCTCCCGTAACGGGACTTTAACCCAACATCTCACGGACACGAGCTGCACGAACAGCCATGCAGGCAT
 TTGTGTCAGAGTTCCTGAAGGCACCAATCCATCTCTGGGAAAAGTTCTTTTCATGTCAAGGCCCCACGCTCCTCC
 CCTTGGGTTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAAACCTTGGC
 GGCCGTACTCCCCAGGGGGTCCAACTTAATGCGTTAGGTTCCGCCCTAAAATTTCCAAGGAATTCAAACGG
 GCAAGTTGGACATCGTTTTACGGGCGTGGGGAATAACCAAGGGTTTTTTATTCTGTTTCTTCCCAGGTTTTGGC
 CCCTCAGTGGGTGTTTTATGTCAGGGTTCGCCCTTCGGCACCGGGTGGGTTCCCTTCTTTTATTACCAATTTTCCC
 TCCACAGGGGAATTTCCCCCCCCCTTCCCGATCTCAACCGCCCGTTTTTGGTGCCCTTCCCCTGTTGAGACCCG
 GGCTTTACCCCTACCAACTTACACGAAAAACCTTTGCCGCGCTTTTACCCCCCTATTTTCCAGTAAAACCTTTCC
 CACCCTCTATTTCCCCGGGGTTTGGGAAACCAAAATGCCCGGGGGTTTTTTGTCCCGGGAACGTCTCAAAAGGC
 AGGATTTTACTTTACGCCCCCCCTTCCAGGTGAGAAGGGTTTACAAATCCCGGAGACCCTTCTTTTTACCCCAA
 CACGCGGGTGTGGACCTTAGGAACCTTCTGGCCTTGGGGCCAAGAATCCCCCGGTGCGGGGCCAGAGACG
 GAACCTGGTGGCCCCCAAGGAAGACTGGGTCAAACCTTTCCCAAACAATTACGGAATCGTCCCCCTGGGGGA
 AACCATTTACCCACCAAA

13- IDENTIFICATION (PI9)

>PI9

GGATGACGGGAGCTTTTCCCTTGATTACGCGCGGACGGGTGAGTAATTCCTAGAATCTGCCTGGTAGTGGGGAC
 AACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCGGGGACCTTCGGGCTTGCCTATC
 AGATGAGCCTAGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGGGGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGA
 GGATGATCAGTCAACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA
 TGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAG
 GAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAG
 CCGCGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTGTTAAGTT
 GGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACCTGCATCCAAAACCTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGT
 GAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGA
 TACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATG
 TCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGC
 CGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGAAGCAAC
 GCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGCATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACAC
 AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCC
 TTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACG
 TCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCG
 AGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAATCCGGAATC
 GCTAGTTAATCGCGAATCAAAATGTGCGGGTGAATACGTTCCCAGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG
 GAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTACCTTCGGGGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGA
 AGTTCGTAACAGGGTAGCCGTAGAAA

14- IDENTIFICATION (BB2)

>BB2

CACCCAGTCATGAATCACACCGGGGTAACCGTTCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTC
 CCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGATTTTACCAGCGACATTTTATTGATTCGCGATTACTAGC
 GATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTC
 GCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTTAGTACGCTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGC
 GTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCGGCGAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGA
 CAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGGTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTG
 TCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGAAAGTTCTCTGCATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCCGCTTG
 CTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTCATTTGAGTTTTAACCTTGGGGCCGTA
 CTCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTCACCGGCTAGTTGACATCGT
 TTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGATCAGTCCA

GGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCAGCTACACAGGAAATTCACCACCCTC
TACCGTACTCTAGCTCGCCAGTTTTGGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTAACGAAC
CACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGA
GTTAGCCGGTGCTTATTCTGTGCGTAACGTCAAAACAGCAAGGTATTAGCTTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAG
TGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACACGCGGCATGGCTGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTTCCC
ACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCTCTCAGACCAGATTACTG
GATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTAGCCTTCACCAGACTAGCTAATTCGGACCTAGGGTCAGTCTGATAGCGCAAG
GACAGAAGGTCCCCTGCTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCCTTTGAAAACGTTGTCCCCACTAC
CAGGCAGATTCTAGGCATTACTCAGCCGTCCGCCGCTGAATCAAGGAGCAAGCTCCCGTCATCCGCTCGACTTG
CAT

II.2 BIOLOG (GENIII)

1- IDENTIFICATION1014041(F8)

Results obtained with the **BIOLOG GENIII** strip (33°C, 24h):

Oxidation of:		• D-salicin:	-	• N-acetyl neuraminic acid:	-
• D-raffinose:	-	• 3-methylglucose:	-	• inosine:	-/+
• α-D-glucose:	-/+	• glycerol:	-/+	• D-serine:	-
• D-sorbitol:	-	• L-aspartic acid:	+	• L-serine:	±
• gelatin:	-	• D-glucuronic acid:	+	• D-saccharic acid:	+
• pectin:	-	• citric acid:	+	• bromo-succinic acid:	-
• p-hydroxyphenylacetic acid:	+	• α-ketobutyric acid:	-	• formic acid:	-
• tween 40:	-	• gentiobiose:	-	Growth in presence of:	
• dextrin:	-	• N-acetyl-D-glucosamine:	-	• 1% NaCl:	+
• α-D-lactose:	-	• D-fucose:	-/+	• 1% sodium lactate:	+
• D-mannose:	±	• D-glucose-6-PO4:	-	• troleandomycin:	+
• D-mannitol:	-	• L-glutamic acid:	+	• lincomycin:	+
• glycyl-L-proline:	-	• glucuronamide:	+	• vancomycin:	+
• D-galacturonic acid:	+	• α-ketoglutaric acid:	±	• nalidixic acid:	+
• methylpyruvate:	-	• acetoacetic acid:	-	• aztreonam:	+
• γ-aminobutyric acid:	+	• sucrose:	-	• pH 6:	+
• D-maltose:	-	• N-acetyl-β-D-mannosamine:	-	• 4% NaCl:	+
• D-melibiose:	-	• L-fucose:	-/+	• fusidic acid:	+
• D-fructose:	-/+	• D-fructose-6-PO4:	-	• rifamycin SV:	+
• D-arabitol:	-	• L-histidine:	+	• guanidine HCl:	+
• L-alanine:	+	• mucic acid:	+	• tetrazolium violet:	+
• L-galactonic acid lactone:	-	• D-malic acid:	-	• lithium chloride:	+
• D-lactic acid methylester:	-	• propionic acid:	±	• sodium butyrate:	+
• α-hydroxybutyric acid:	-	• D-turanose:	-	• pH 5:	+
• D-trehalose:	-	• N-acetyl-D-galactosamine:	-	• 8% NaCl:	+
• β-methyl-D-glucoside:	-	• L-rhamnose:	-	• D-serine:	+
• D-galactose:	-	• D-aspartic acid:	-	• minocycline:	+
• myo-inositol:	-	• L-pyroglutamic acid:	+	• niaproof 4:	+
• L-arginine:	±	• quinic acid:	+	• tetrazolium blue:	+
• D-gluconic acid:	±	• L-malic acid:	+	• potassium tellurite:	+
• L-lactic acid:	±	• acetic acid:	+	• sodium bromate:	+
• β-hydroxy-D, L-butyric acid:	-	• stachyose:	-		
• D-cellobiose:	-				

Symbols: -, negative; +/- borderline; ± positive; +, strong positive.

2- IDENTIFICATION1014042 (F19)

Results obtained with the **BIOLOG GENIII** strip (33°C, 24h):

Oxidation of:		• D-salicin:	-	• N-acetyl neuraminic acid:	-
• D-raffinose:	-	• 3-methylglucose:	-	• inosine:	-/+
• α-D-glucose:	-/+	• glycerol:	-/+	• D-serine:	-
• D-sorbitol:	-	• L-aspartic acid:	±	• L-serine:	±
• gelatin:	-	• D-glucuronic acid:	+	• D-saccharic acid:	-/+
• pectin:	-	• citric acid:	+	• bromo-succinic acid:	-
• p-hydroxyphenylacetic acid:	±	• α-ketobutyric acid:	-	• formic acid:	-
• tween 40:	-	• gentiobiose:	-	Growth in presence of:	
• dextrin:	-	• N-acetyl-D-glucosamine:	-	• 1% NaCl:	+
• α-D-lactose:	-	• D-fucose:	-/+	• 1% sodium lactate:	+
• D-mannose:	-/+	• D-glucose-6-PO4:	-	• troleandomycin:	+
• D-mannitol:	-	• L-glutamic acid:	±	• lincomycin:	+
• glycy-L-proline:	-	• glucuronamide:	±	• vancomycin:	+
• D-galacturonic acid:	±	• α-ketoglutaric acid:	±	• nalidixic acid:	-/+
• methylpyruvate:	-	• acetoacetic acid:	-	• aztreonam:	-/+
• γ-aminobutyric acid:	+	• sucrose:	-	• pH 6:	+
• D-maltose:	-	• N-acetyl-β-D-mannosamine:	-	• 4% NaCl:	+
• D-melibiose:	-	• L-fucose:	-/+	• fusidic acid:	+
• D-fructose:	-/+	• D-fructose-6-PO4:	-/+	• rifamycin SV:	+
• D-arabitol:	-	• L-histidine:	-	• guanidine HCl:	+
• L-alanine:	±	• mucic acid:	-/+	• tetrazolium violet:	+
• L-galactonic acid lactone:	-	• D-malic acid:	-	• lithium chloride:	+
• D-lactic acid methylester:	-	• propionic acid:	±	• sodium butyrate:	+
• α-hydroxybutyric acid:	-	• D-turanose:	-	• pH 5:	+
• D-trehalose:	-	• N-acetyl-D-galactosamine:	-	• 8% NaCl:	+
• β-methyl-D-glucoside:	-	• L-rhamnose:	-	• D-serine:	+
• D-galactose:	-	• D-aspartic acid:	-	• minocycline:	+
• myo-inositol:	-	• L-pyroglutamic acid:	±	• niaproof 4:	+
• L-arginine:	±	• quinic acid:	+	• tetrazolium blue:	+
• D-gluconic acid:	±	• L-malic acid:	+	• potassium tellurite:	+
• L-lactic acid:	±	• acetic acid:	+	• sodium bromate:	+
• β-hydroxy-D, L-butyric acid:	-/+	• stachyose:	-		
• D-cellobiose:	-				

Symbols: -, negative; -/+ borderline; ± positive; +, strong positive.

3- IDENTIFICATION1014043 (F20)

Results obtained with the **BIOLOG GENIII** strip (33°C, 24h):

Oxidation of:		• D-salicin:	-	• N-acetyl neuraminic acid:	-
• D-raffinose:	-	• 3-methylglucose:	-	• inosine:	-
• α-D-glucose:	±	• glycerol:	-	• D-serine:	-/4
• D-sorbitol:	-	• L-aspartic acid:	-	• L-serine:	-/4
• gelatin:	-	• D-glucuronic acid:	-/+	• D-saccharic acid:	-
• pectin:	-	• citric acid:	+	• bromo-succinic acid:	-
• p-hydroxyphenylacetic acid:	±	• α-ketobutyric acid:	+	• formic acid:	-
• tween 40:	-	• gentiobiose:	-	Growth in presence of:	
• dextrin:	-	• N-acetyl-D-glucosamine:	-	• 1% NaCl:	+
• α-D-lactose:	-	• D-fucose:	±	• 1% sodium lactate:	+
• D-mannose:	±	• D-glucose-6-PO4:	-	• troleandomycin:	+
• D-mannitol:	-	• L-glutamic acid:	-	• lincomycin:	+
• glycy-L-proline:	-	• glucuronamide:	±	• vancomycin:	+
• D-galacturonic acid:	-/+	• α-ketoglutaric acid:	±	• nalidixic acid:	-
• methylpyruvate:	-	• acetoacetic acid:	+	• aztreonam:	-
• γ-aminobutyric acid:	-	• sucrose:	-	• pH 6:	+
• D-maltose:	-	• N-acetyl-β-D-mannosamine:	-	• 4% NaCl:	-
• D-melibiose:	-	• L-fucose:	±	• fusidic acid:	-
• D-fructose:	-/+	• D-fructose-6-PO4:	±	• rifamycin SV:	+
• D-arabitol:	-	• L-histidine:	-/+	• guanidine HCl:	-
• L-alanine:	-	• mucic acid:	-	• tetrazolium violet:	+
• L-galactonic acid lactone:	-	• D-malic acid:	-	• lithium chloride:	+
• D-lactic acid methylester:	-	• propionic acid:	-	• sodium butyrate:	-
• α-hydroxybutyric acid:	-	• D-turanose:	-	• pH 5:	-
• D-trehalose:	-	• N-acetyl-D-galactosamine:	-	• 8% NaCl:	-
• β-methyl-D-glucoside:	-	• L-rhamnose:	+	• D-serine:	+
• D-galactose:	±	• D-aspartic acid:	-	• minocycline:	-
• myo-inositol:	+	• L-pyroglutamic acid:	-	• niaproof 4:	+
• L-arginine:	-	• quinic acid:	+	• tetrazolium blue:	+
• D-gluconic acid:	-	• L-malic acid:	±	• potassium tellurite:	+
• L-lactic acid:	±	• acetic acid:	-	• sodium bromate:	-
• β-hydroxy-D, L-butyric acid:	-	• stachyose:	-		
• D-cellobiose:	-				

Symbols: -, negative; -/+ borderline; ± positive; +, strong positive.

4- IDENTIFICATION1014044 (F23)

Results obtained with the **BIOLOG GENIII** strip (33°C, 24h):

Oxidation of:		• D-salicin:	-	• N-acetyl neuraminic acid:	-
• D-raffinose:	-	• 3-methylglucose:	-	• inosine:	-
• α-D-glucose:	±	• glycerol:	-	• D-serine:	-/+
• D-sorbitol:	-	• L-aspartic acid:	-	• L-serine:	-
• gelatin:	-	• D-glucuronic acid:	-/+	• D-saccharic acid:	-
• pectin:	-	• citric acid:	+	• bromo-succinic acid:	-
• p-hydroxyphenylacetic acid:	±	• α-ketobutyric acid:	±	• formic acid:	-
• tween 40:	-	• gentiobiose:	-	Growth in presence of:	
• dextrin:	-	• N-acetyl-D-glucosamine:	-	• 1% NaCl:	+
• α-D-lactose:	-	• D-fucose:	±	• 1% sodium lactate:	+
• D-mannose:	±	• D-glucose-6-PO4:	-	• troleandomycin:	+
• D-mannitol:	-	• L-glutamic acid:	-	• lincomycin:	+
• glycyl-L-proline:	-	• glucuronamide:	±	• vancomycin:	+
• D-galacturonic acid:	-/+	• α-ketoglutaric acid:	±	• nalidixic acid:	-
• methylpyruvate:	-	• acetoacetic acid:	±	• aztreonam:	-
• γ-aminobutyric acid:	-	• sucrose:	-	• pH 6:	+
• D-maltose:	-	• N-acetyl-β-D-mannosamine:	-	• 4% NaCl:	-
• D-melibiose:	-	• L-fucose:	±	• fusidic acid:	-
• D-fructose:	-/+	• D-fructose-6-PO4:	±	• rifamycin SV:	+
• D-arabitol:	-	• L-histidine:	-/+	• guanidine HCl:	-
• L-alanine:	-	• mucic acid:	-	• tetrazolium violet:	+
• L-galactonic acid lactone:	-	• D-malic acid:	-	• lithium chloride:	+
• D-lactic acid methylester:	-	• propionic acid:	-	• sodium butyrate:	-
• α-hydroxybutyric acid:	-	• D-turanose:	-	• pH 5:	-
• D-trehalose:	-	• N-acetyl-D-galactosamine:	-	• 8% NaCl:	-
• β-methyl-D-glucoside:	-	• L-rhamnose:	+	• D-serine:	+
• D-galactose:	±	• D-aspartic acid:	-	• minocycline:	-
• myo-inositol:	+	• L-pyroglutamic acid:	-	• niaproof 4:	+
• L-arginine:	-	• quinic acid:	+	• tetrazolium blue:	+
• D-gluconic acid:	-	• L-malic acid:	+	• potassium tellurite:	+
• L-lactic acid:	±	• acetic acid:	-/+	• sodium bromate:	-
• β-hydroxy-D, L-butyric acid:	-	• stachyose:	-		
• D-cellobiose:	-				

Symbols: -, negative; -/+ borderline; ± positive; +, strong positive.

5- IDENTIFICATION1014045 (F27)

Results obtained with the **BIOLOG GENIII** strip (33°C, 24h):

Oxidation of:		• D-salicin:	-	• N-acetyl neuraminic acid:	-
• D-raffinose:	-	• 3-methylglucose:	-	• inosine:	-
• α-D-glucose:	-	• glycerol:	-	• D-serine:	-
• D-sorbitol:	-	• L-aspartic acid:	-	• L-serine:	-
• gelatin:	-	• D-glucuronic acid:	-/+	• D-saccharic acid:	-
• pectin:	-	• citric acid:	-	• bromo-succinic acid:	-
• p-hydroxyphenylacetic acid:	-	• α-ketobutyric acid:	-	• formic acid:	-
• tween 40:	-	• gentiobiose:	-	Growth in presence of:	
• dextrin:	-	• N-acetyl-D-glucosamine:	-	• 1% NaCl:	-/+
• α-D-lactose:	-	• D-fucose:	-	• 1% sodium lactate:	+
• D-mannose:	-/+	• D-glucose-6-PO4:	-	• troleandomycin:	-
• D-mannitol:	-	• L-glutamic acid:	-	• lincomycin:	-
• glycyl-L-proline:	-	• glucuronamide:	-/+	• vancomycin:	-
• D-galacturonic acid:	-/+	• α-ketoglutaric acid:	-	• nalidixic acid:	-
• methylpyruvate:	-	• acetoacetic acid:	-	• aztreonam:	-
• γ-aminobutyric acid:	-	• sucrose:	-	• pH 6:	-
• D-maltose:	-	• N-acetyl-β-D-mannosamine:	-	• 4% NaCl:	-
• D-melibiose:	-	• L-fucose:	-	• fusidic acid:	-
• D-fructose:	-	• D-fructose-6-PO4:	-/+	• rifamycin SV:	-
• D-arabitol:	-	• L-histidine:	-	• guanidine HCl:	-
• L-alanine:	-	• mucic acid:	-	• tetrazolium violet:	-
• L-galactonic acid lactone:	-	• D-malic acid:	-	• lithium chloride:	-
• D-lactic acid methylester:	-	• propionic acid:	-	• sodium butyrate:	-
• α-hydroxybutyric acid:	-	• D-turanose:	-	• pH 5:	-
• D-trehalose:	-	• N-acetyl-D-galactosamine:	-	• 8% NaCl:	-
• β-methyl-D-glucoside:	-	• L-rhamnose:	-	• D-serine:	-
• D-galactose:	-/+	• D-aspartic acid:	-	• minocycline:	-
• myo-inositol:	-	• L-pyroglutamic acid:	-	• niaproof 4:	-
• L-arginine:	-	• quinic acid:	-/+	• tetrazolium blue:	-
• D-gluconic acid:	-	• L-malic acid:	-	• potassium tellurite:	-
• L-lactic acid:	-	• acetic acid:	-	• sodium bromate:	-
• β-hydroxy-D, L-butyric acid:	-	• stachyose:	-		
• D-cellobiose:	-				

Symbols: -, negative; +/- borderline; ± positive; +, strong positive.

6- IDENTIFICATION1014047 (BB6)

Results obtained with the **BIOLOG GENIII** strip (33°C, 24h):

Oxidation of:					
• D-raffinose:	-	• D-salicin:	-	• N-acetyl neuraminic acid:	-
• α-D-glucose:	±	• 3-methylglucose:	-	• inosine:	-
• D-sorbitol:	-	• glycerol:	-	• D-serine:	-
• gelatin:	-	• L-aspartic acid:	-	• L-serine:	-
• pectin:	-	• D-glucuronic acid:	-/+	• D-saccharic acid:	-
• p-hydroxyphenylacetic acid:	±	• citric acid:	+	• bromo-succinic acid:	-
• tween 40:	-	• α-ketobutyric acid:	+	• formic acid:	-
• dextrin:	-	• gentiobiose:	-	Growth in presence of:	
• α-D-lactose:	-	• N-acetyl-D-glucosamine:	-	• 1% NaCl:	+
• D-mannose:	±	• D-fucose:	±	• 1% sodium lactate:	+
• D-mannitol:	-	• D-glucose-6-PO4:	-	• troleandomycin:	+
• glycy-L-proline:	-	• L-glutamic acid:	-	• lincomycin:	+
• D-galacturonic acid:	-	• glucuronamide:	±	• vancomycin:	+
• methylpyruvate:	-	• α-ketoglutaric acid:	±	• nalidixic acid:	-
• γ-aminobutyric acid:	-	• acetoacetic acid:	+	• aztreonam:	-
• D-maltose:	-	• sucrose:	-	• pH 6:	+
• D-melibiose:	-	• N-acetyl-β-D-mannosamine:	-	• 4% NaCl:	-
• D-fructose:	-/+	• L-fucose:	±	• fusidic acid:	-
• D-arabitol:	-	• D-fructose-6-PO4:	±	• rifamycin SV:	+
• L-alanine:	-	• L-histidine:	-	• guanidine HCl:	-
• L-galactonic acid lactone:	-	• mucic acid:	-	• tetrazolium violet:	+
• D-lactic acid methylester:	-	• D-malic acid:	-	• lithium chloride:	+
• α-hydroxybutyric acid:	-	• propionic acid:	-	• sodium butyrate:	-
• D-trehalose:	-	• D-turanose:	-	• pH 5:	-
• β-methyl-D-glucoside:	-	• N-acetyl-D-galactosamine:	-	• 8% NaCl:	-
• D-galactose:	±	• L-rhamnose:	+	• D-serine:	+
• myo-inositol:	+	• D-aspartic acid:	-	• minocycline:	-
• L-arginine:	-	• L-pyroglutamic acid:	-	• niaproof 4:	+
• D-gluconic acid:	-	• quinic acid:	+	• tetrazolium blue:	+
• L-lactic acid:	±	• L-malic acid:	+	• potassium tellurite:	+
• β-hydroxy-D, L-butyric acid:	-	• acetic acid:	-	• sodium bromate:	-
• D-cellobiose:	-	• stachyose:	-		

Symbols: -, negative; -/+ borderline; ± positive; +, strong positive.

7- IDENTIFICATION(BS4)

Results obtained with the **BIOLOG GENIII** strip (33°C, 24h):

Oxidation of:					
• D-raffinose:	-	• D-salicin:	-	• N-acetyl neuraminic acid:	-
• α-D-glucose:	±	• 3-methylglucose:	-	• inosine:	-
• D-sorbitol:	-	• glycerol:	±	• D-serine:	±
• gelatin:	-	• L-aspartic acid:	+	• L-serine:	-
• pectin:	-	• D-glucuronic acid:	+	• D-saccharic acid:	+
• p-hydroxyphenylacetic acid:	-	• citric acid:	+	• bromo-succinic acid:	-
• tween 40:	-	• α-ketobutyric acid:	-	• formic acid:	-
• dextrin:	-	• gentiobiose:	-	Growth in presence of:	
• α-D-lactose:	-	• N-acetyl-D-glucosamine:	-	• 1% NaCl:	+
• D-mannose:	+	• D-fucose:	±	• 1% sodium lactate:	+
• D-mannitol:	-	• D-glucose-6-PO4:	-	• troleandomycin:	+
• glycy-L-proline:	-	• L-glutamic acid:	+	• lincomycin:	+
• D-galacturonic acid:	+	• glucuronamide:	+	• vancomycin:	+
• methylpyruvate:	-	• α-ketoglutaric acid:	±	• nalidixic acid:	+
• γ-aminobutyric acid:	+	• acetoacetic acid:	-	• aztreonam:	+
• D-maltose:	-	• sucrose:	-	• pH 6:	+
• D-melibiose:	-	• N-acetyl-β-D-mannosamine:	-	• 4% NaCl:	+
• D-fructose:	±	• L-fucose:	-/+	• fusidic acid:	+
• D-arabitol:	-	• D-fructose-6-PO4:	-	• rifamycin SV:	+
• L-alanine:	±	• L-histidine:	+	• guanidine HCl:	+
• L-galactonic acid lactone:	-	• mucic acid:	+	• tetrazolium violet:	+
• D-lactic acid methylester:	-	• D-malic acid:	-	• lithium chloride:	+
• α-hydroxybutyric acid:	-	• propionic acid:	-/+	• sodium butyrate:	+
• D-trehalose:	-	• D-turanose:	-	• pH 5:	+
• β-methyl-D-glucoside:	-	• N-acetyl-D-galactosamine:	-	• 8% NaCl:	-
• D-galactose:	-/+	• L-rhamnose:	-	• D-serine:	+
• myo-inositol:	-	• D-aspartic acid:	-	• minocycline:	+
• L-arginine:	±	• L-pyroglutamic acid:	+	• niaproof 4:	+
• D-gluconic acid:	+	• quinic acid:	+	• tetrazolium blue:	+
• L-lactic acid:	±	• L-malic acid:	+	• potassium tellurite:	+
• β-hydroxy-D, L-butyric acid:	-/+	• acetic acid:	+	• sodium bromate:	+
• D-cellobiose:	-	• stachyose:	-		

Symbols: -, negative; -/+ borderline; ± positive; +, strong positive.

8- IDENTIFICATION1014052(PI11)

Results obtained with the **BIOLOG GENIII** strip (33°C, 24h):

Oxidation of:					
• D-raffinose:	-	• D-salicin:	-	• N-acetyl neuraminic acid:	-
• α-D-glucose:	+	• 3-methylglucose:	-	• inosine:	-
• D-sorbitol:	-	• glycerol:	-/+	• D-serine:	+
• gelatin:	-	• L-aspartic acid:	+	• L-serine:	±
• pectin:	-	• D-glucuronic acid:	+	• D-saccharic acid:	+
• p-hydroxyphenylacetic acid:	-	• citric acid:	+	• bromo-succinic acid:	-
• tween 40:	-	• α-ketobutyric acid:	±	• formic acid:	-
• dextrin:	-	• gentiobiose:	-	Growth in presence of:	
• α-D-lactose:	-	• N-acetyl-D-glucosamine:	-	• 1% NaCl:	+
• D-mannose:	+	• D-fucose:	±	• 1% sodium lactate:	+
• D-mannitol:	-	• D-glucose-6-PO4:	-	• troleandomycin:	+
• glycy-L-proline:	-	• L-glutamic acid:	+	• lincomycin:	+
• D-galacturonic acid:	+	• glucuronamide:	+	• vancomycin:	+
• methylpyruvate:	-	• α-ketoglutaric acid:	±	• nalidixic acid:	+
• γ-aminobutyric acid:	+	• acetoacetic acid:	-	• aztreonam:	-/+
• D-maltose:	-	• sucrose:	+	• pH 6:	+
• D-melibiose:	-	• N-acetyl-β-D-mannosamine:	-	• 4% NaCl:	+
• D-fructose:	-/+	• L-fucose:	-/+	• fusidic acid:	+
• D-arabitol:	-	• D-fructose-6-PO4:	-	• rifamycin SV:	+
• L-alanine:	+	• L-histidine:	+	• guanidine HCl:	+
• L-galactonic acid lactone:	-	• mucic acid:	+	• tetrazolium violet:	+
• D-lactic acid methylester:	-	• D-malic acid:	-	• lithium chloride:	+
• α-hydroxybutyric acid:	-	• propionic acid:	±	• sodium butyrate:	+
• D-trehalose:	-	• D-turanose:	-	• pH 5:	+
• β-methyl-D-glucoside:	-	• N-acetyl-D-galactosamine:	-	• 8% NaCl:	-
• D-galactose:	-	• L-rhamnose:	-	• D-serine:	+
• myo-inositol:	-	• D-aspartic acid:	-	• minocycline:	-/+
• L-arginine:	+	• L-pyroglutamic acid:	+	• niaproof 4:	+
• D-gluconic acid:	+	• quinic acid:	+	• tetrazolium blue:	+
• L-lactic acid:	+	• L-malic acid:	+	• potassium tellurite:	+
• β-hydroxy-D, L-butyric acid:	±	• acetic acid:	±	• sodium bromate:	-
• D-cellobiose:	-	• stachyose:	-		

Symbols: -, negative; -/+ borderline; ± positive; +, strong positive.

9- IDENTIFICATION1014054(BT7)

Results obtained with the **BIOLOG GENIII** strip (33°C, 24h):

Oxidation of:					
• D-raffinose:	-	• D-salicin:	-	• N-acetyl neuraminic acid:	-
• α-D-glucose:	+	• 3-methylglucose:	-	• inosine:	-
• D-sorbitol:	-	• glycerol:	±	• D-serine:	+
• gelatin:	-	• L-aspartic acid:	+	• L-serine:	+
• pectin:	-	• D-glucuronic acid:	+	• D-saccharic acid:	+
• p-hydroxyphenylacetic acid:	-	• citric acid:	+	• bromo-succinic acid:	-
• tween 40:	-	• α-ketobutyric acid:	-/+	• formic acid:	-
• dextrin:	-	• gentiobiose:	-	Growth in presence of:	
• α-D-lactose:	-	• N-acetyl-D-glucosamine:	-	• 1% NaCl:	+
• D-mannose:	±	• D-fucose:	±	• 1% sodium lactate:	+
• D-mannitol:	-	• D-glucose-6-PO4:	-	• troleandomycin:	+
• glycy-L-proline:	-	• L-glutamic acid:	+	• lincomycin:	+
• D-galacturonic acid:	+	• glucuronamide:	+	• vancomycin:	+
• methylpyruvate:	-	• α-ketoglutaric acid:	±	• nalidixic acid:	+
• γ-aminobutyric acid:	+	• acetoacetic acid:	-	• aztreonam:	±
• D-maltose:	-	• sucrose:	+	• pH 6:	+
• D-melibiose:	-	• N-acetyl-β-D-mannosamine:	-	• 4% NaCl:	+
• D-fructose:	±	• L-fucose:	-/+	• fusidic acid:	+
• D-arabitol:	-	• D-fructose-6-PO4:	-	• rifamycin SV:	+
• L-alanine:	-	• L-histidine:	+	• guanidine HCl:	+
• L-galactonic acid lactone:	-	• mucic acid:	+	• tetrazolium violet:	+
• D-lactic acid methylester:	-	• D-malic acid:	-	• lithium chloride:	+
• α-hydroxybutyric acid:	-	• propionic acid:	+	• sodium butyrate:	±
• D-trehalose:	-	• D-turanose:	-	• pH 5:	+
• β-methyl-D-glucoside:	-	• N-acetyl-D-galactosamine:	-	• 8% NaCl:	-
• D-galactose:	-	• L-rhamnose:	-	• D-serine:	+
• myo-inositol:	-	• D-aspartic acid:	-	• minocycline:	+
• L-arginine:	+	• L-pyroglutamic acid:	+	• niaproof 4:	+
• D-gluconic acid:	+	• quinic acid:	+	• tetrazolium blue:	+
• L-lactic acid:	+	• L-malic acid:	+	• potassium tellurite:	+
• β-hydroxy-D, L-butyric acid:	-/+	• acetic acid:	+	• sodium bromate:	-
• D-cellobiose:	-	• stachyose:	-		

Symbols: -, negative; +/- borderline; ± positive; +, strong positive.

10- IDENTIFICATION(F21)

Results obtained with the **BIOLOG GENIII** strip (33°C, 24h):

Oxidation of:		• D-salicin:	-	• N-acetyl neuraminic acid:	-
• D-raffinose:	-	• 3-methylglucose:	-	• Inosine:	-
• α-D-glucose:	±	• glycerol:	-	• D-serine:	±
• D-sorbitol:	-	• L-aspartic acid:	-/+	• L-serine:	±
• gelatin:	-	• D-glucuronic acid:	-	• D-saccharic acid:	-
• pectin:	-	• citric acid:	+	• bromo-succinic acid:	-
• p-hydroxyphenylacetic acid:	+	• α-ketobutyric acid:	+	• formic acid:	-
• tween 40:	-	• gentiobiose:	-	Growth in presence of:	
• dextrin:	-	• N-acetyl-D-glucosamine:	-	• 1% NaCl:	+
• α-D-lactose:	-	• D-fucose:	-/+	• 1% sodium lactate:	+
• D-mannose:	±	• D-glucose-6-PO ₄ :	-	• troleandomycin:	+
• D-mannitol:	-	• L-glutamic acid:	-/+	• lincomycin:	+
• glycyl-L-proline:	-	• glucuronamide:	±	• vancomycin:	+
• D-galacturonic acid:	-	• α-ketoglutaric acid:	+	• nalidixic acid:	-
• methylpyruvate:	-	• acetoacetic acid:	±	• aztreonam:	-
• γ-aminobutyric acid:	-	• sucrose:	-	• pH 6:	+
• D-maltose:	-	• N-acetyl-β-D-mannosamine:	-	• 4% NaCl:	-
• D-melibiose:	-	• L-fucose:	-/+	• fusidic acid:	-
• D-fructose:	-/+	• D-fructose-6-PO ₄ :	-/+	• rifamycin SV:	+
• D-arabitol:	-	• L-histidine:	-/+	• guanidine HCl:	-
• L-alanine:	-	• mucic acid:	-	• tetrazolium violet:	+
• L-galactonic acid lactone:	-	• D-malic acid:	-	• lithium chloride:	+
• D-lactic acid methylester:	-	• propionic acid:	-	• sodium butyrate:	-
• α-hydroxybutyric acid:	-	• D-turanose:	-	• pH 5:	-
• D-trehalose:	-	• N-acetyl-D-galactosamine:	-	• 8% NaCl:	-
• β-methyl-D-glucoside:	-	• L-rhamnose:	+	• D-serine:	+
• D-galactose:	±	• D-aspartic acid:	-	• minocycline:	-
• myo-inositol:	±	• L-pyroglutamic acid:	-/+	• niaproof 4:	+
• L-arginine:	-/+	• quinic acid:	+	• tetrazolium blue:	+
• D-gluconic acid:	-/+	• L-malic acid:	+	• potassium tellurite:	-/+
• L-lactic acid:	+	• acetic acid:	±	• sodium bromate:	-
• β-hydroxy-D ,L-butyric acid:	-	• stachyose:	-		
• D-cellobiose:	-				

Symbols: -, negative; -/+ borderline; ± positive; +, strong positive.

11- IDENTIFICATION (BB9)

Results obtained with the **BIOLOG GENIII** strip (33°C, 24h):

Oxidation of:		• D-salicin:	-	• N-acetyl neuraminic acid:	-
• D-raffinose:	-	• 3-methylglucose:	-	• inosine:	-
• α-D-glucose:	±	• glycerol:	±	• D-serine:	-/+
• D-sorbitol:	-	• L-aspartic acid:	+	• L-serine:	-/+
• gelatin:	-	• D-glucuronic acid:	+	• D-saccharic acid:	+
• pectin:	-	• citric acid:	+	• bromo-succinic acid:	-
• p-hydroxyphenylacetic acid:	-	• α-ketobutyric acid:	-/+	• formic acid:	-
• tween 40:	-	• gentiobiose:	-	Growth in presence of:	
• dextrin:	-	• N-acetyl-D-glucosamine:	-	• 1% NaCl:	+
• α-D-lactose:	-	• D-fucose:	±	• 1% sodium lactate:	+
• D-mannose:	±	• D-glucose-6-PO4:	-	• troleandomycin:	+
• D-mannitol:	-	• L-glutamic acid:	+	• lincomycin:	+
• glycy-L-proline:	-	• glucuronamide:	+	• vancomycin:	+
• D-galacturonic acid:	+	• α-ketoglutaric acid:	+	• nalidixic acid:	+
• methylpyruvate:	-	• acetoacetic acid:	-	• aztreonam:	±
• γ-aminobutyric acid:	+	• sucrose:	-	• pH 6:	+
• D-maltose:	-	• N-acetyl-β-D-mannosamine:	-	• 4% NaCl:	+
• D-melibiose:	-	• L-fucose:	-/+	• fusidic acid:	+
• D-fructose:	-/+	• D-fructose-6-PO4:	-	• rifamycin SV:	+
• D-arabitol:	-	• L-histidine:	+	• guanidine HCl:	+
• L-alanine:	+	• mucic acid:	+	• tetrazolium violet:	+
• L-galactonic acid lactone:	+	• D-malic acid:	-	• lithium chloride:	+
• D-lactic acid methylester:	-	• propionic acid:	±	• sodium butyrate:	+
• α-hydroxybutyric acid:	-	• D-turanose:	-	• pH 5:	+
• D-trehalose:	-	• N-acetyl-D-galactosamine:	-	• 8% NaCl:	-
• β-methyl-D-glucoside:	-	• L-rhamnose:	-	• D-serine:	+
• D-galactose:	-/+	• D-aspartic acid:	-	• minocycline:	-
• myo-Inositol:	-	• L-pyroglutamic acid:	+	• niaproof 4:	+
• L-arginine:	+	• quinic acid:	+	• tetrazolium blue:	+
• D-gluconic acid:	+	• L-malic acid:	+	• potassium tellurite:	+
• L-lactic acid:	+	• acetic acid:	±	• sodium bromate:	+
• β-hydroxy-D, L-butyric acid:	-/+	• stachyose:	-		
• D-cellobiose:	-				

Symbols: -, negative; -/+ borderline; ± positive; +, strong positive.

12- IDENTIFICATION (GP4)

Results obtained with the **BIOLOG GENIII** strip (33°C, 24h):

Oxidation of:		• D-salicin:	-	• N-acetyl neuraminic acid:	-
• D-raffinose:	-	• 3-methylglucose:	-	• inosine:	-/+
• α-D-glucose:	±	• glycerol:	±	• D-serine:	+
• D-sorbitol:	-	• L-aspartic acid:	±	• L-serine:	-/+
• gelatin:	-	• D-glucuronic acid:	±	• D-saccharic acid:	±
• pectin:	-	• citric acid:	+	• bromo-succinic acid:	-
• p-hydroxyphenylacetic acid:	-	• α-ketobutyric acid:	-	• formic acid:	-
• tween 40:	-	• gentiobiose:	-	Growth in presence of:	
• dextrin:	-	• N-acetyl-D-glucosamine:	-	• 1% NaCl:	+
• α-D-lactose:	-	• D-fucose:	-/+	• 1% sodium lactate:	+
• D-mannose:	±	• D-glucose-6-PO4:	-	• troleandomycin:	+
• D-mannitol:	-	• L-glutamic acid:	±	• lincomycin:	+
• glycy-L-proline:	-	• glucuronamide:	±	• vancomycin:	+
• D-galacturonic acid:	±	• α-ketoglutaric acid:	±	• nalidixic acid:	+
• methylpyruvate:	-	• acetoacetic acid:	-	• aztreonam:	+
• γ-aminobutyric acid:	+	• sucrose:	-	• pH 6:	+
• D-maltose:	-	• N-acetyl-β-D-mannosamine:	-	• 4% NaCl:	+
• D-melibiose:	-	• L-fucose:	-/+	• fusidic acid:	+
• D-fructose:	-/+	• D-fructose-6-PO4:	-/+	• rifamycin SV:	+
• D-arabitol:	-	• L-histidine:	±	• guanidine HCl:	+
• L-alanine:	-	• mucic acid:	±	• tetrazolium violet:	+
• L-galactonic acid lactone:	-	• D-malic acid:	-	• lithium chloride:	+
• D-lactic acid methylester:	-	• propionic acid:	±	• sodium butyrate:	+
• α-hydroxybutyric acid:	-	• D-turanose:	-	• pH 5:	+
• D-trehalose:	-	• N-acetyl-D-galactosamine:	-	• 8% NaCl:	-
• β-methyl-D-glucoside:	-	• L-rhamnose:	-	• D-serine:	+
• D-galactose:	-/+	• D-aspartic acid:	-	• minocycline:	+
• myo-inositol:	-	• L-pyroglutamic acid:	±	• niaproof 4:	+
• L-arginine:	±	• quinic acid:	+	• tetrazolium blue:	+
• D-gluconic acid:	±	• L-malic acid:	+	• potassium tellurite:	+
• L-lactic acid:	±	• acetic acid:	+	• sodium bromate:	+
• β-hydroxy-D, L-butyric acid:	-/+	• stachyose:	-		
• D-cellobiose:	-				

Symbols: -, negative; -/+ borderline; ± positive; +, strong positive.

13- IDENTIFICATION (PI9)

Results obtained with the **BIOLOG GENIII** strip (33°C, 24h):

Oxidation of:		• D-salicin:	-	• N-acetyl neuraminic acid:	-
• D-raffinose:	-	• 3-methylglucose:	-/+	• inosine:	-
• α -D-glucose:	-/+	• glycerol:	-	• D-serine:	-
• D-sorbitol:	-	• L-aspartic acid:	-	• L-serine:	-
• gelatin:	-	• D-glucuronic acid:	-/+	• D-saccharic acid:	-
• pectin:	-	• citric acid:	+	• bromo-succinic acid:	-
• p-hydroxyphenylacetic acid:	±	• α -ketobutyric acid:	+	• formic acid:	-
• tween 40:	-	• gentiobiose:	-	Growth in presence of:	
• dextrin:	-	• N-acetyl-D-glucosamine:	-	• 1% NaCl:	+
• α -D-lactose:	-	• D-fucose:	±	• 1% sodium lactate:	+
• D-mannose:	±	• D-glucose-6-PO ₄ :	-	• troleandomycin:	+
• D-mannitol:	-	• L-glutamic acid:	-	• lincomycin:	+
• glycyl-L-proline:	-	• glucuronamide:	+	• vancomycin:	+
• D-galacturonic acid:	-/+	• α -ketoglutaric acid:	-/+	• nalidixic acid:	-
• methylpyruvate:	-	• acetoacetic acid:	+	• aztreonam:	-
• γ -aminobutyric acid:	-	• sucrose:	-	• pH 6:	+
• D-maltose:	-	• N-acetyl- β -D-mannosamine:	-	• 4% NaCl:	-
• D-melibiose:	-	• L-fucose:	±	• fusidic acid:	-
• D-fructose:	-/+	• D-fructose-6-PO ₄ :	-/+	• rifamycin SV:	+
• D-arabitol:	-	• L-histidine:	-	• guanidine HCl:	-
• L-alanine:	-	• mucic acid:	-	• tetrazolium violet:	+
• L-galactonic acid lactone:	-	• D-malic acid:	-	• lithium chloride:	+
• D-lactic acid methylester:	-	• propionic acid:	-	• sodium butyrate:	-
• α -hydroxybutyric acid:	-	• D-turanose:	-	• pH 5:	-
• D-trehalose:	-	• N-acetyl-D-galactosamine:	-	• 8% NaCl:	-
• β -methyl-D-glucoside:	-	• L-rhamnose:	+	• D-serine:	+
• D-galactose:	+	• D-aspartic acid:	-	• minocycline:	-
• myo-inositol:	+	• L-pyroglutamic acid:	-	• niaproof 4:	+
• L-arginine:	-	• quinic acid:	+	• tetrazolium blue:	+
• D-gluconic acid:	-	• L-malic acid:	+	• potassium tellurite:	+
• L-lactic acid:	-/+	• acetic acid:	-	• sodium bromate:	-
• β -hydroxy-D, L-butyric acid:	-	• stachyose:	-		
• D-cellobiose:	-				

Symbols: -, negative; -/+ borderline; ± positive; +, strong positive.

14- IDENTIFICATION (BB2)

Results obtained with the **BIOLOG GENIII** strip (33°C, 24h):

Oxidation of:		• D-salicin:	-	• N-acetyl neuraminic acid:	-
• D-raffinose:	-	• 3-methylglucose:	-	• inosine:	-
• α-D-glucose:	-/+	• glycerol:	-	• D-serine:	-
• D-sorbitol:	-	• L-aspartic acid:	-	• L-serine:	-
• gelatin:	-	• D-glucuronic acid:	-/+	• D-saccharic acid:	-
• pectin:	-	• citric acid:	+	• bromo-succinic acid:	-
• p-hydroxyphenylacetic acid:	-/+	• α-ketobutyric acid:	+	• formic acid:	-
• tween 40:	-	• gentiobiose:	-	Growth in presence of:	
• dextrin:	-	• N-acetyl-D-glucosamine:	-	• 1% NaCl:	+
• α-D-lactose:	-	• D-fucose:	-/+	• 1% sodium lactate:	+
• D-mannose:	-/+	• D-glucose-6-PO4:	-	• troleandomycin:	+
• D-mannitol:	-	• L-glutamic acid:	-	• lincomycin:	+
• glycyl-L-proline:	-	• glucuronamide:	±	• vancomycin:	+
• D-galacturonic acid:	-/+	• α-ketoglutaric acid:	-/+	• nalidixic acid:	±
• methylpyruvate:	-	• acetoacetic acid:	+	• aztreonam:	-
• γ-aminobutyric acid:	-	• sucrose:	-	• pH 6:	+
• D-maltose:	-	• N-acetyl-β-D-mannosamine:	-	• 4% NaCl:	-
• D-melibiose:	-	• L-fucose:	±	• fusidic acid:	-
• D-fructose:	-	• D-fructose-6-PO4:	-/+	• rifamycin SV:	+
• D-arabitol:	-	• L-histidine:	-	• guanidine HCl:	-
• L-alanine:	-	• mucic acid:	-	• tetrazolium violet:	+
• L-galactonic acid lactone:	-	• D-malic acid:	-	• lithium chloride:	+
• D-lactic acid methylester:	-	• propionic acid:	-	• sodium butyrate:	-
• α-hydroxybutyric acid:	-	• D-turanose:	-	• pH 5:	-
• D-trehalose:	-	• N-acetyl-D-galactosamine:	-	• 8% NaCl:	-
• β-methyl-D-glucoside:	-	• L-rhamnose:	+	• D-serine:	+
• D-galactose:	±	• D-aspartic acid:	-	• minocycline:	-
• myo-inositol:	+	• L-pyroglutamic acid:	-	• niaproof 4:	+
• L-arginine:	-	• quinic acid:	+	• tetrazolium blue:	+
• D-gluconic acid:	-	• L-malic acid:	+	• potassium tellurite:	+
• L-lactic acid:	-/+	• acetic acid:	-	• sodium bromate:	-
• β-hydroxy-D, L-butyric acid:	-	• stachyose:	-		
• D-cellobiose:	-				

Symbols: -, negative; -/+ borderline; ± positive; +, strong positive.

15- IDENTIFICATION (F21)

Results obtained with the **BIOLOG GENIII** strip (33°C, 24h):

Oxidation of:		• D-salicin:	-	• N-acetyl neuraminic acid:	-
• D-raffinose:	-	• 3-methylglucose:	-	• inosine:	-
• α -D-glucose:	\pm	• glycerol:	-	• D-serine:	-
• D-sorbitol:	-	• L-aspartic acid:	-	• L-serine:	-
• gelatin:	-	• D-glucuronic acid:	-/+	• D-saccharic acid:	-
• pectin:	-	• citric acid:	+	• bromo-succinic acid:	-
• p-hydroxyphenylacetic acid:	-/+	• α -ketobutyric acid:	+	• formic acid:	-
• tween 40:	-	• gentiobiose:	-	Growth in presence of:	
• dextrin:	-	• N-acetyl-D-glucosamine:	-	• 1% NaCl:	+
• α -D-lactose:	-	• D-fucose:	-/+	• 1% sodium lactate:	+
• D-mannose:	\pm	• D-glucose-6-PO ₄ :	-	• troleandomycin:	+
• D-mannitol:	-	• L-glutamic acid:	-	• lincomycin:	+
• glycyl-L-proline:	-	• glucuronamide:	\pm	• vancomycin:	+
• D-galacturonic acid:	-/+	• α -ketoglutaric acid:	-/+	• nalidixic acid:	-
• methylpyruvate:	-	• acetoacetic acid:	+	• aztreonam:	-
• γ -aminobutyric acid:	-	• sucrose:	-	• pH 6:	+
• D-maltose:	-	• N-acetyl- β -D-mannosamine:	-	• 4% NaCl:	-
• D-melibiose:	-	• L-fucose:	-/+	• fusidic acid:	-
• D-fructose:	-/+	• D-fructose-6-PO ₄ :	-/+	• rifamycin SV:	+
• D-arabitol:	-	• L-histidine:	-	• guanidine HCl:	-
• L-alanine:	-	• mucic acid:	-	• tetrazolium violet:	+
• L-galactonic acid lactone:	-	• D-malic acid:	-	• lithium chloride:	+
• D-lactic acid methylester:	-	• propionic acid:	-	• sodium butyrate:	-
• α -hydroxybutyric acid:	-	• D-turanose:	-	• pH 5:	-
• D-trehalose:	-	• N-acetyl-D-galactosamine:	-	• 8% NaCl:	-
• β -methyl-D-glucoside:	-	• L-rhamnose:	\pm	• D-serine:	+
• D-galactose:	\pm	• D-aspartic acid:	-	• minocycline:	-
• myo-inositol:	+	• L-pyroglutamic acid:	-	• niaproof 4:	+
• L-arginine:	-	• quinic acid:	+	• tetrazolium blue:	+
• D-gluconic acid:	-	• L-malic acid:	-/+	• potassium tellurite:	+
• L-lactic acid:	-/+	• acetic acid:	-	• sodium bromate:	-
• β -hydroxy-D, L-butyric acid:	-	• stachyose:	-		
• D-cellobiose:	-				

Symbols: -, negative; +/- borderline; \pm positive; +, strong positive.

II.3 Résultat des analyses statistiques de la caractérisation des profils trophiques (BIOLOG)

ID Result	Species ID: <i>Pseudomonas mendocina</i>	ID 14041 (F8)
ID Comment		
ID Notice		

	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
==>1	0.916	0.700	4.457	GN-NENT	<i>Pseudomonas mendocina</i>
2	0.067	0.046	5.402	GN-NENT	<i>Pseudomonas putida</i> biotype B
3	0.014	0.009	5.977	GN-NENT	<i>Pseudomonas maculicola</i>
4	0.004	0.003	6.401	GN-NENT	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

< X >:Pos; < X --:Mismatched Pos; X:Neg; X ++:Mismatched Neg; { X } :Borderline; -X:Less Than A1 well

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >
C	{ 75 }	< 250--	{ 75 }	0	0	{ 75 }	{ 75 }	0	{ 75 }	< 250 >	< 250 >	< 250 >
D	0	0	0	0	{ 75 }	0	0	0	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >
E	0	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >
F	0	< 250 >	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >
G	< 250--	0	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >	0	< 250 >	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >
H	0	< 250 >	0	{ 75 }	0	0	< 250 >	< 250 >	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >

ID Result	Species ID: <i>Pseudomonas mendocina</i>	ID 14042 (F19)
ID Comment		
ID Notice		

	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
==>1	0.914	0.699	4.531	GN-NENT	<i>Pseudomonas mendocina</i>
2	0.048	0.033	5.594	GN-NENT	<i>Pseudomonas putida</i> biotype B
3	0.027	0.019	5.795	GN-NENT	<i>Pseudomonas maculicola</i>
4	0.010	0.007	6.143	GN-NENT	<i>Pseudomonas fulva</i>

< X >:Pos; < X --:Mismatched Pos; X:Neg; X ++:Mismatched Neg; { X } :Borderline; -X:Less Than A1 well

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	13	-3	-2	-1	1	2	1	2	< 727 >	< 732 >	< 709 >
B	-3	-1	2	0	2	-1	2	2	2	< 835 >	< 851 >	279
C	< 260 >	< 319--	< 173 >	23	4	61	65	15	< 154 >	< 1074 >	< 754 >	< 870 >
D	-2	0	3	2	< 241 >	1	34	-4	14	< 867 >	< 739 >	< 797 >
E	5	5	< 454 >	< 233 >	< 356 >	< 396 >	61	< 404 >	< 274 >	< 673 >	< 741 >	< 703 >
F	0	< 334 >	7	< 286 >	< 375 >	< 164 >	< 218 >	< 544 >	< 293 >	< 658 >	< 1746 >	< 1536 >
G	< 397--	{ 102 }	5	< 398 >	< 408 >	< 207 >	9	< 385 >	62	< 614 >	< 978 >	< 774 >
H	80	< 465 >	11	< 179 >	30	12	< 376 >	< 405 >	46	241	< 885 >	< 825 >

ID Result	Species ID: <i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype C	ID 14043 (F20)
ID Comment		
ID Notice		

	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
==>1	1.000	0.764	4.184	GN-NENT	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype C
2	0.000	0.000	7.288	GN-NENT	<i>Pseudomonas fragi</i>
3	0.000	0.000	8.124	GN-NENT	<i>Pseudomonas taetrolens</i>
4	0.000	0.000	8.717	GN-NENT	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>aceris</i>

< X >:Pos; < X --:Mismatched Pos; X:Neg; X ++:Mismatched Neg; { X } :Borderline; -X:Less Than A1 well

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	10	-4	51	0	3	1	6	2	< 817 >	< 701 >	59
B	0	0	6	1	1	23	7	2	1	< 789 >	179	33
C	< 192 >	< 180 >	< 115 >	< 192 >	33	< 115 >	< 123 >	< 319 >	15	< 839 >	188	{ 405 }
D	-2	20	14	< 369 >	33	-2	{ 89 }	-8	82	< 625 >	< 784 >	47
E	0	5	24	41	66	83	65	73	{ 95 }	< 726 >	57	< 636 >
F	5	49	2	36	50	< 151 >	11	< 276 >	0	< 733 >	< 1291 >	< 838 >
G	< 159 >	28	5	< 144 >	< 474 >	< 194 >	9	< 178 >	25	167	{ 401 }	< 514 >
H	24	60	1	50	< 195 >	< 195 >	7	20	0	64	50	66

ID Result	Species ID: <i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype C	ID 14044 (F23)
ID Comment		
ID Notice		

	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
==>1	0.998	0.763	4.314	GN-NENT	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype C
2	0.001	0.001	6.665	GN-NENT	<i>Pseudomonas fragi</i>
3	0.000	0.000	8.255	GN-NENT	<i>Pseudomonas taetrolens</i>
4	0.000	0.000	8.499	GN-NENT	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>aceris</i>

< X >:Pos; < X -:Mismatched Pos; X:Neg; X ++:Mismatched Neg; { X } :Borderline; -X:Less Than A1 well

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	12	0	50	1	8	3	7	4	< 754 >	< 681 >	77
B	0	0	3	2	-1	26	7	5	2	< 814 >	182	35
C	< 180 >	< 162 >	< 108 >	< 168 >	23	< 107 >	< 125 >	< 333 >	16	< 812 >	250	< 508 >
D	2	25	18	< 291 >	38	2	78	-8	43	< 590 >	< 770 >	50
E	2	6	19	41	55	84	68	47	73	< 719 >	60	< 734 >
F	3	54	4	60	64	< 134 >	14	< 249 >	3	< 799 >	< 942 >	< 831 >
G	< 121 >	33	8	< 150 >	< 477 >	< 188 >	12	< 202 >	24	173	{ 396 }	< 609 >
H	25	54	2	27	< 218 >	< 157 >	6	54	4	60	59	73

ID Result	No ID	ID 14045 (F27)
ID Comment		
ID Notice		

	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
==>1	---	0.252	3.811	GN-NENT	<i>Pseudomonas fragi</i>
2	---	0.195	4.106	GP-ROD	<i>Lactobacillus kefir</i>
3	---	0.168	4.327	GN-FAS	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
4	---	0.162	4.378	GP-COCCUS	<i>Enterococcus avium</i>

< X >:Pos; < X -:Mismatched Pos; X:Neg; X ++:Mismatched Neg; { X } :Borderline; -X:Less Than A1 well

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	{ 75 }	0	0
C	0	{ 75 }	0	{ 75 }	0	0	0++	0	0	< 250 >	0	0
D	0	0	0	0	0	0	{ 75 }	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F	0	{ 75 }	0	0	{ 75 }	{ 75 }	0	{ 75 }	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ID Result	Species ID: <i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype C	ID 14046 (F48)
ID Comment		
ID Notice		

	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
==>1	0.993	0.721	4.760	GN-NENT	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype C
2	0.007	0.004	6.560	GN-NENT	<i>Pseudomonas fragi</i>
3	0.001	0.000	7.404	GN-NENT	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
4	0.000	0.000	8.270	GN-NENT	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>aceris</i>

< X >:Pos; < X -:Mismatched Pos; X:Neg; X ++:Mismatched Neg; { X } :Borderline; -X:Less Than A1 well

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	17	-1	39	1	15	4	7	4	< 670 >	< 627 >	68
B	0	-2	6	1	3	20	9	4	5	< 658 >	154	28
C	< 174 >	< 166 >	{ 117 }	< 178 >	33	{ 119 }	< 137 >	< 303 >	14	< 753 >	51	< 471 >
D	2	35	17	< 283 >	33	2	{ 96 }	-5	32	< 563 >	< 694 >	46
E	-2	6	21	29	45	{ 91 }	54	63	45	< 663 >	49	< 649 >
F	9	47	9	40	{ 76 }	{ 120 }	16	< 233 >	4	< 738 >	< 914 >	< 912 >
G	{ 110 }	35	9	< 146 >	< 463 >	< 165 >	12	< 207 >	24	112	{ 392 }	< 598 >
H	28	{ 81 }	1	36	< 214 >	< 167 >	-1	46	8	50	51	71

ID Result	Species ID: <i>Pseudomonas mendocina</i>	ID 14047 (BB6)
ID Comment		
ID Notice		

	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
==>1	0.853	0.619	5.152	GN-NENT	<i>Pseudomonas mendocina</i>
2	0.124	0.085	5.849	GN-NENT	<i>Pseudomonas putida</i> biotype B
3	0.018	0.012	6.547	GN-NENT	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
4	0.006	0.004	6.957	GN-NENT	<i>Pseudomonas putida</i> biotype A

< X >:Pos; < X -:Mismatched Pos; X:Neg; X ++:Mismatched Neg; { X } :Borderline; -X:Less Than A1 well

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	< 250 >	< 250 >	0
C	< 250 >	< 250 -	< 250 >	{ 75 }	0	< 250 >	{ 75 }	0	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >
D	0	0	0	0	< 250 >	0	0	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >
E	0	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	0++	< 250 >	< 250 >	< 250 >
F	0	< 250 >	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >
G	0	0	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >	0	< 250 >	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >
H	0	< 250 >	0	{ 75 }	0	0	{ 75 }	< 250 >	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >

ID Result	Genus ID: <i>Pseudomonas</i>	ID 14048 (BB10)
ID Comment		
ID Notice		

	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
==>1	---	0.400	6.474	GN-NENT	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
2	---	0.099	6.956	GN-NENT	<i>Pseudomonas putida</i> biotype A
3	---	0.093	6.979	GN-NENT	<i>Pseudomonas putida</i> biotype B
4	---	0.046	7.232	GN-NENT	<i>Pseudomonas maculicola</i>

< X >:Pos; < X -:Mismatched Pos; X:Neg; X ++:Mismatched Neg; { X } :Borderline; -X:Less Than A1 well

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	< 250 >	0	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	< 250 >	< 250 >	0
C	< 250 >	< 250 >	{ 75 }	0++	0	< 250 >	{ 75 }	0	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >
D	0	0	0	0	{ 75 }	0	0	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >	{ 75 }
E	0	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >
F	0	< 250 >	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >
G	0	0	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >	0	< 250 >	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >
H	0	< 250 >	0	< 250 >	< 250 -	0	< 250 >	< 250 >	0	{ 75 }	< 250 -	0

ID Result	Genus ID: <i>Pseudomonas</i>	ID 14049 (GP4)
ID Comment		
ID Notice		

	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
==>1	---	0.444	4.543	GN-NENT	<i>Pseudomonas putida</i> biotype B
2	---	0.120	4.996	GN-NENT	<i>Pseudomonas mendocina</i>
3	---	0.119	5.000	GN-NENT	<i>Pseudomonas maculicola</i>
4	---	0.065	5.220	GN-NENT	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

< X >:Pos; < X -:Mismatched Pos; X:Neg; X ++:Mismatched Neg; { X } :Borderline; -X:Less Than A1 well

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	16	0	-1	2	8	< 328 >	5	1	< 951 >	< 875 >	< 934 >
B	-1	-4	1	-3	-3	-2	2	0	-1	< 981 >	< 623 >	175
C	< 350 >	< 174 >	< 166 >	40	0	{ 124 }	60	16	{ 88 }	< 1168 >	< 819 >	< 1098 -
D	-2	-3	-3	-2	< 167 >	-2	28	-13	< 504 >	< 986 >	< 844 >	< 727 >
E	-1	6	{ 76 }	< 560 >	< 554 >	< 515 >	< 642 >	< 491 >	< 189 >	< 961 >	< 688 >	< 887 >
F	40	< 546 >	-2	< 404 >	< 556 >	< 282 >	< 611 >	< 770 >	< 542 >	< 977 >	< 1937 >	< 2009 >
G	-4	{ 76 }	3	< 530 >	< 712 >	< 327 >	10	< 670 >	36	< 882 >	< 843 >	< 1121 >
H	43	< 445 >	8	< 231 >	< 169 >	15	< 406 >	< 508 >	31	307	{ 438 }	{ 403 }

ID Result	Species ID: Pseudomonas fluorescens biotype C	ID 14050 (BS4)
ID Comment		
ID Notice		

	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
=>1	1.000	0.841	3.136	GN-NENT	Pseudomonas fluorescens biotype C
2	0.000	0.000	7.642	GN-NENT	Pseudomonas lundensis
3	0.000	0.000	7.739	GN-NENT	Pseudomonas fragi
4	0.000	0.000	7.891	GN-NENT	Pseudomonas marginalis

< X >:Pos; < X ->:Mismatched Pos; X:Neg; X ++:Mismatched Neg; { X } :Borderline; -X:Less Than A1 well

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	13	-5	74	-1	5	1	3	-1	< 800 >	< 818 >	58
B	-2	-6	-1	-1	0	40	6	-2	-1	< 803 >	112	27
C	< 205 >	< 174 >	{ 113 }	< 218 >	19	{ 91 }	{ 84 }	< 392 >	65	< 830 >	175	< 676 >
D	-3	32	18	{ 125 }	62	-4	57	-9	{ 122 }	< 618 >	< 820 >	47
E	-4	1	{ 94 }	< 166 >	< 162 >	< 210 >	{ 141 }	< 142 >	< 216 >	< 706 >	194	< 517 >
F	-3	25	-3	< 198 >	36	{ 106 }	9	< 482 >	-4	< 787 >	< 1698 >	< 683 >
G	< 525 >	{ 86 }	1	< 386 >	< 609 >	< 335 >	10	< 451 >	52	48	{ 386 }	248
H	36	{ 98 }	20	{ 101 }	< 197 >	{ 123 }	56	< 204 >	4	53	51	67

ID Result	Genus ID: Pseudomonas	ID 14051 (PI9)
ID Comment		
ID Notice		

	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
=>1	---	0.475	3.930	GN-NENT	Pseudomonas viridilivida
2	---	0.177	4.287	GN-NENT	Pseudomonas fluorescens
3	---	0.092	4.522	GN-NENT	Pseudomonas putida biotype B
4	---	0.019	5.064	GN-NENT	Pseudomonas mendocina

< X >:Pos; < X ->:Mismatched Pos; X:Neg; X ++:Mismatched Neg; { X } :Borderline; -X:Less Than A1 well

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	15	-2	0	0	8	4	5	4	< 940 >	< 922 >	< 932 >
B	1	-3	4	-2	1	-3	3	1	2	< 860 >	< 763 >	107
C	< 235 >	< 212 >	< 199 >	64	8	{ 140 }	{ 83 }	30	{ 72 }	< 998 >	< 915 >	< 736 >
D	-2	4	0	1	< 301 >	-1	32	-14	42	< 901 >	< 955 >	51
E	-2	9	< 299 >	< 453 >	< 513 >	< 477 >	< 539 >	< 524 >	{ 147 }	< 915 >	< 847 >	< 945 >
F	4	< 235 >	1	< 380 >	< 336 >	< 228 >	< 540 >	< 806 >	< 415 >	< 938 >	< 1840 >	< 1756 >
G	-2	{ 68 }	4	< 323 >	< 524 >	< 317 >	17	< 514 >	57	{ 509 }	364	< 1026 >
H	25	< 576 >	12	< 213 >	{ 98 }	14	< 283 >	< 332 >	27	255	< 706 >	< 645 >

ID Result	Species ID: Pseudomonas putida biotype B	ID 14052 (PI11)
ID Comment		
ID Notice		

	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
=>1	0.707	0.514	5.022	GN-NENT	Pseudomonas putida biotype B
2	0.275	0.190	5.362	GN-NENT	Pseudomonas mendocina
3	0.012	0.009	6.480	GN-NENT	Pseudomonas fluorescens
4	0.005	0.003	6.790	GN-NENT	Pseudomonas putida

< X >:Pos; < X ->:Mismatched Pos; X:Neg; X ++:Mismatched Neg; { X } :Borderline; -X:Less Than A1 well

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	< 250 >	< 250 >	0
C	< 250 >	< 250 >	{ 75 }	{ 75 }	0	{ 75 }	{ 75 }	0	{ 75 }	< 250 >	< 250 >	< 250 ->
D	0	0	0	0	< 250 >	0	{ 75 }	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >
E	0	0	0++	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	{ 75 }	< 250 >	< 250 >	< 250 >
F	0	< 250 >	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >	< 250 >
G	0	{ 0 }	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >	0	< 250 >	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >
H	0	< 250 >	0	{ 75 }	0	0	< 250 >	< 250 >	0	< 250 >	< 250 >	< 250 >

ID Result	Species ID: <i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype C	ID 14053 (BT3)
ID Comment		
ID Notice		

	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
==>1	0.955	0.694	4.675	GN-NENT	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype C
2	0.041	0.029	5.807	GN-NENT	<i>Pseudomonas fragi</i>
3	0.003	0.002	6.750	GN-NENT	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>aceris</i>
4	0.000	0.000	7.660	GN-NENT	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

< X >:Pos; < X -:Mismatched Pos; X:Neg; X ++:Mismatched Neg; { X } :Borderline; -X:Less Than A1 well

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	17	-3	16	-2	19	-1	-2	1	< 380 >	< 317 >	69
B	2	-3	8	4	0	10	4	2	-2	< 402 >	110	37
C	{ 72 }	{ 133 }	{ 88 }	{ 132 }	38	{ 88 }	{ 117 }	< 221 >	5	< 449 >	85	< 334 >
D	0	8	5	< 215 >	21	2	{ 76 }	-9	26	< 362 >	< 417 >	49
E	1	8	14	6	15	26	16	17	37	< 314 >	59	< 401 >
F	7	34	3	14	55	{ 107 }	4	< 170 >	-2	< 371 >	< 264 >	< 387 >
G	{ 96 }	13	9	{ 71 }	< 275 >	{ 89 }	4	{ 104 }	0	{ 161 }	< 268 >	< 466 >
H	18	23	-4	14	{ 137 }	{ 97 }	-10	-2	-1	58	57	60

ID Result	Species ID: <i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype C	ID 14054 (BT7)
ID Comment		
ID Notice		

	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
==>1	0.955	0.694	5.123	GN-NENT	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype C
2	0.030	0.019	6.377	GN-NENT	<i>Pseudomonas fragi</i>
3	0.014	0.009	6.640	GN-NENT	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
4	0.001	0.001	7.458	GN-NENT	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>aceris</i>

< X >:Pos; < X -:Mismatched Pos; X:Neg; X ++:Mismatched Neg; { X } :Borderline; -X:Less Than A1 well

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	29	-5	36	0	28	2	5	1	< 695 >	< 568 >	68
B	3	0	6	2	4	16	7	2	-3	< 824 >	188	29
C	< 129 >	< 137 >	{ 89 }	< 189 >	32	{ 115 }	< 143 >	< 306 >	9	< 863 >	99	< 445 >
D	1	18	10	< 215 >	21	-3	{ 89 }	-8	36	< 584 >	< 662 >	49
E	-5	2	12	5	29	58	7	33	36	< 634 >	67	< 631 >
F	2	{ 64 }	2	27	{ 76 }	< 142 >	6	< 198 >	1	< 678 >	< 919 >	< 875 >
G	{ 85 }	26	4	{ 90 }	< 289 >	{ 95 }	9	< 149 >	25	< 266 >	{ 358 }	< 589 >
H	19	47	1	16	< 185 >	{ 112 }	-6	7	0	59	57	73

ID Result	Species ID: <i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype C	ID 14055 (F21)
ID Comment		
ID Notice		

	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
==>1	0.990	0.757	4.142	GN-NENT	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype C
2	0.009	0.006	5.846	GN-NENT	<i>Pseudomonas fragi</i>
3	0.001	0.000	6.736	GN-NENT	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>aceris</i>
4	0.000	0.000	7.473	GN-NENT	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

< X >:Pos; < X -:Mismatched Pos; X:Neg; X ++:Mismatched Neg; { X } :Borderline; -X:Less Than A1 well

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	11	-1	27	0	3	3	3	0	< 409 >	< 316 >	73
B	3	-1	0	1	2	12	3	-1	-2	< 432 >	126	36
C	{ 102 }	{ 131 }	70	{ 125 }	27	71	{ 95 }	< 217 >	6	< 447 >	151	< 375 >
D	2	9	7	< 204 >	17	1	68	-7	20	< 382 >	< 434 >	50
E	4	5	10	6	16	28	17	18	34	< 344 >	58	< 362 >
F	1	30	3	13	50	{ 115 }	5	{ 155 }	0	< 390 >	< 272 >	< 360 >
G	69	11	7	60	< 247 >	{ 99 }	7	69	10	132	< 280 >	< 458 >
H	17	26	1	20	{ 130 }	{ 119 }	-5	4	3	70	54	65

III. 1 Rapport d'analyse par H.P.L.C

Produit analysé : (33)090713

Date d'analyse : 09/07/13 10:43:48

Méthode : C: \CLASS-VP\METHODS\E1.met

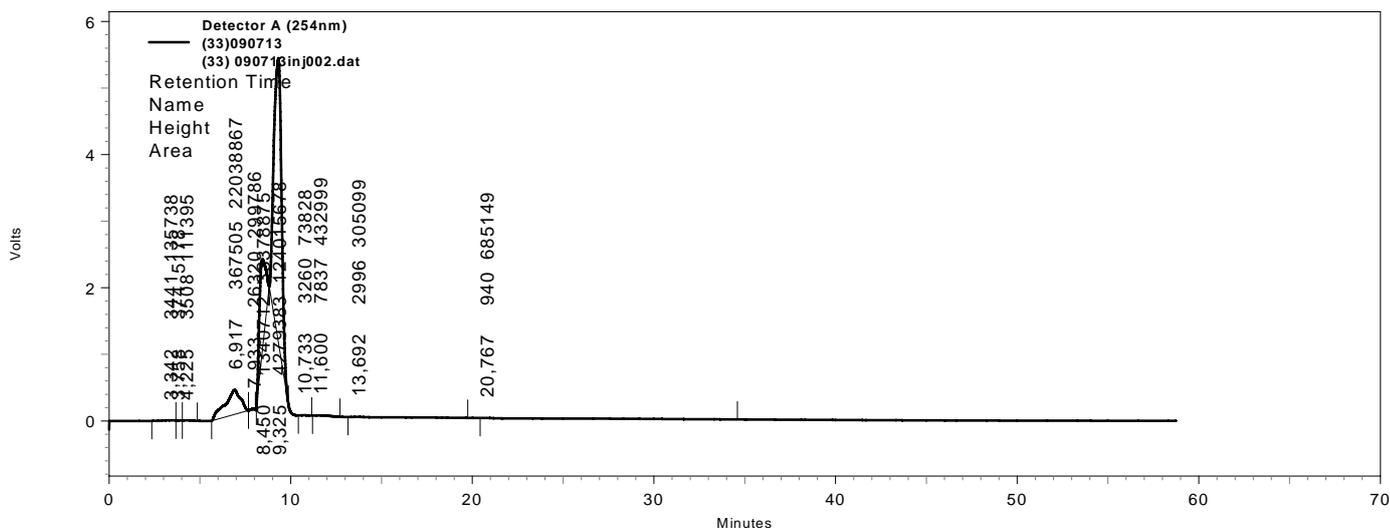
Fichier DATA : C:\WINDOWS\Bureau\ABDELI\ (33) 090713inj002.dat

Conditions d'analyse : Colonne C18

Débit 1,5 ml/mn

Température 25° C

Volume d'injection 20 µl



Detector A (220nm)

PK #	Name	Retention Time	Area	Area Percent	Height
1		3,342	135738	0,07	3441
2		3,758	5178	0,00	374
3		4,225	111395	0,06	3508
4		6,917	22038867	12,14	367505
5		7,933	299786	0,17	26320
6		8,450	33378875	18,39	1340712
7		9,325	124015678	68,33	4279383
8		10,733	73828	0,04	3260
9		11,600	432999	0,24	7837
10		13,692	305099	0,17	2996
11		20,767	685149	0,38	940
Totals			181482592	100,00	6036276

Produit analysé : (33nv) 090713

Date d'analyse : 09/07/13 11:43:33

Méthode : C:\CLASS-VP\METHODS\E1.met

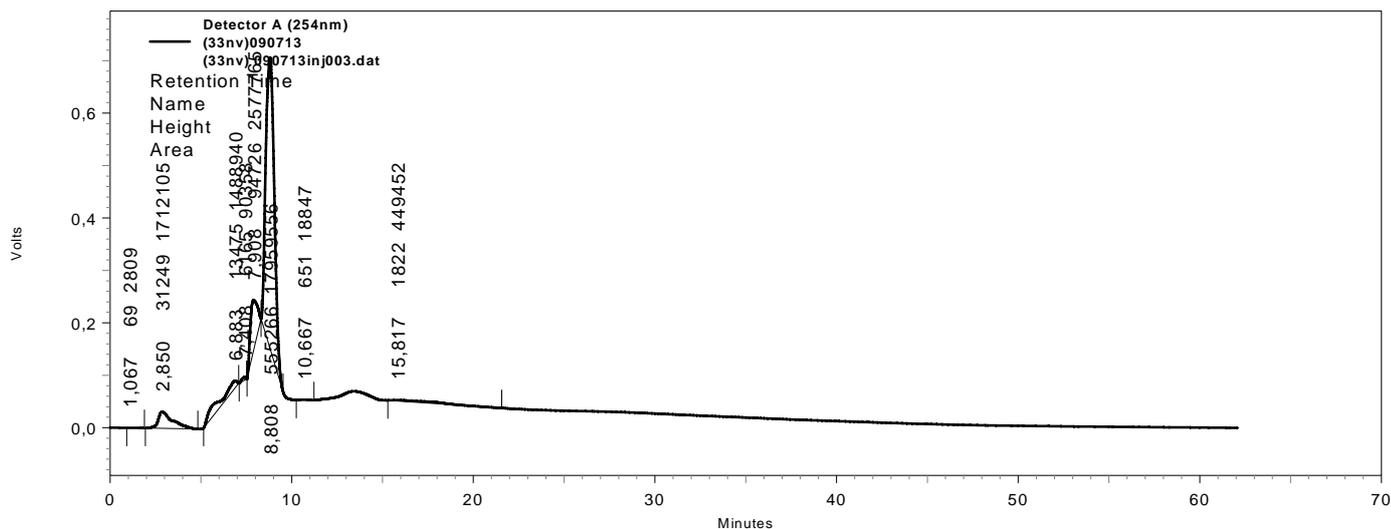
Fichier DATA : C:\WINDOWS\Bureau\ABDELI\33nv) 090713inj003.dat

Conditions d'analyse : Colonne C18

Débit 1,5 ml/mn

Température 25° C

Volume d'injection 20 µl



**Detector A
(220nm)**

Pk #	Name	Retention Time	Area	Area Percent	Height
1		1,067	2809	0,01	69
2		2,850	1712105	7,05	31249
3		6,883	1488940	6,13	13475
4		7,408	90358	0,37	6165
5		7,908	2577765	10,61	94726
6		8,808	17959556	73,91	555266
7		10,667	18847	0,08	651
8		15,817	449452	1,85	1822
Totals			24299832	100,00	703423

Produit analysé : (39nv) 090713

Date d'analyse : 09/07/13 13:58:52

Méthode : C:\CLASS-VP\METHODS\E1.met

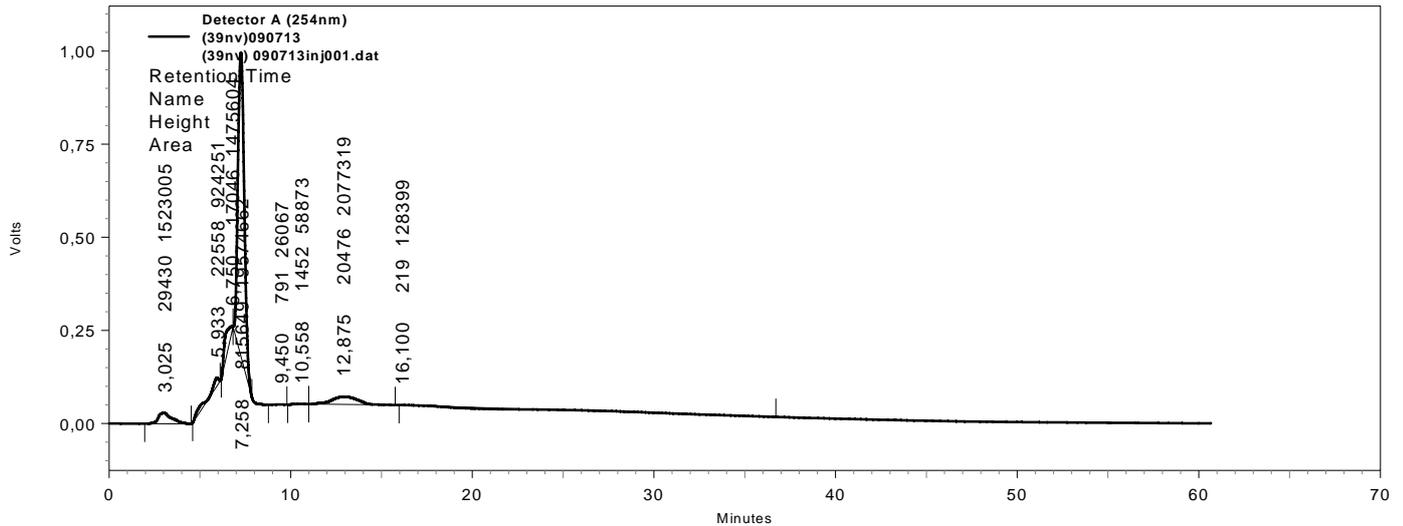
Fichier DATA : C:\WINDOWS\Bureau\ABDELI\39nv) 090713inj001.dat

Conditions d'analyse : Colonne C18

Débit 1,5 ml/mn

Température 25° C

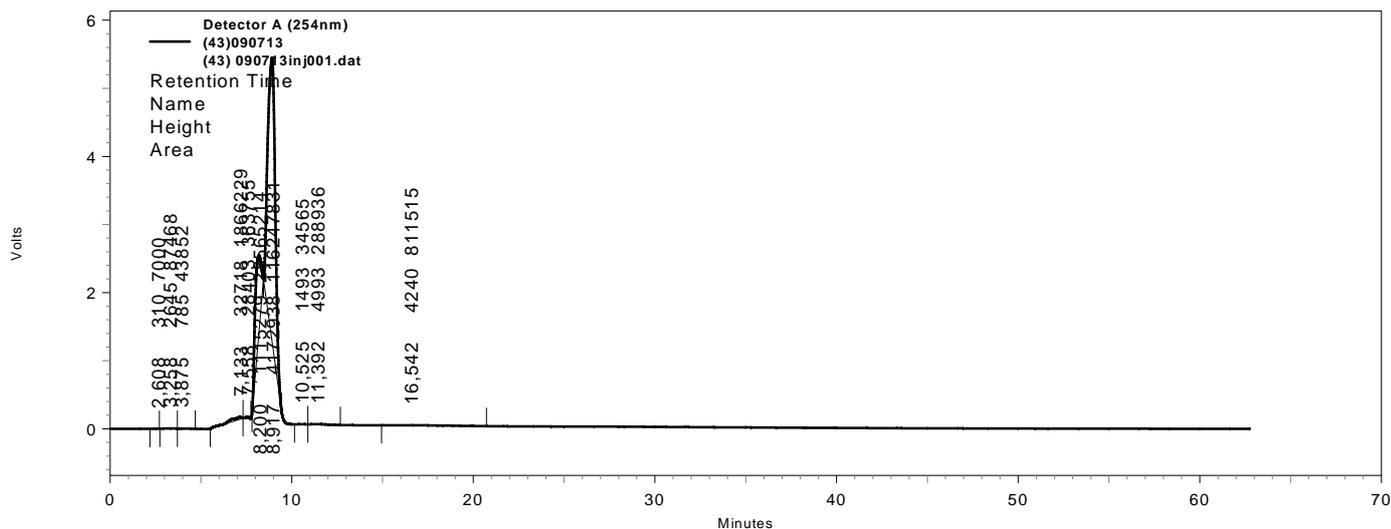
Volume d'injection 20 µl



**Detector A
(220nm)**

Pk #	Name	Retention Time	Area	Area Percent	Height
1		3,025	1523005	5,91	29430
2		5,933	924251	3,58	22558
3		6,750	1475604	5,72	17046
4		7,258	19574662	75,91	815649
5		9,450	26067	0,10	791
6		10,558	58873	0,23	1452
7		12,875	2077319	8,06	20476
8		16,100	128399	0,50	219
Totals			25788180	100,00	907621

Produit analysé : (43)090713
Date d'analyse : 09/07/13 15:01:29
Méthode : C:\CLASS-VP\METHODS\E1.met
Fichier DATA : C:\WINDOWS\Bureau\ABDELI\43) 090713inj001.dat
Conditions d'analyse : Colonne C18
 Débit 1,5 ml/mn
 Température 25° C
 Volume d'injection 20 µl



**Detector A
(220nm)**

Pk #	Name	Retention Time	Area	Area Percent	Height
1		2,608	7000	0,00	310
2		3,258	87468	0,06	2645
3		3,875	43852	0,03	785
4		7,133	1866229	1,26	32718
5		7,558	363755	0,25	28403
6		8,200	28565214	19,26	1115279
7		8,917	116247831	78,38	4172938
8		10,525	34565	0,02	1493
9		11,392	288936	0,19	4993
10		16,542	811515	0,55	4240
Totals			148316365	100,00	5363804

Produit analysé : (43nv) 090713

Date d'analyse : 09/07/13 12:47:08

Méthode : C:\CLASS-VP\METHODS\E1.met

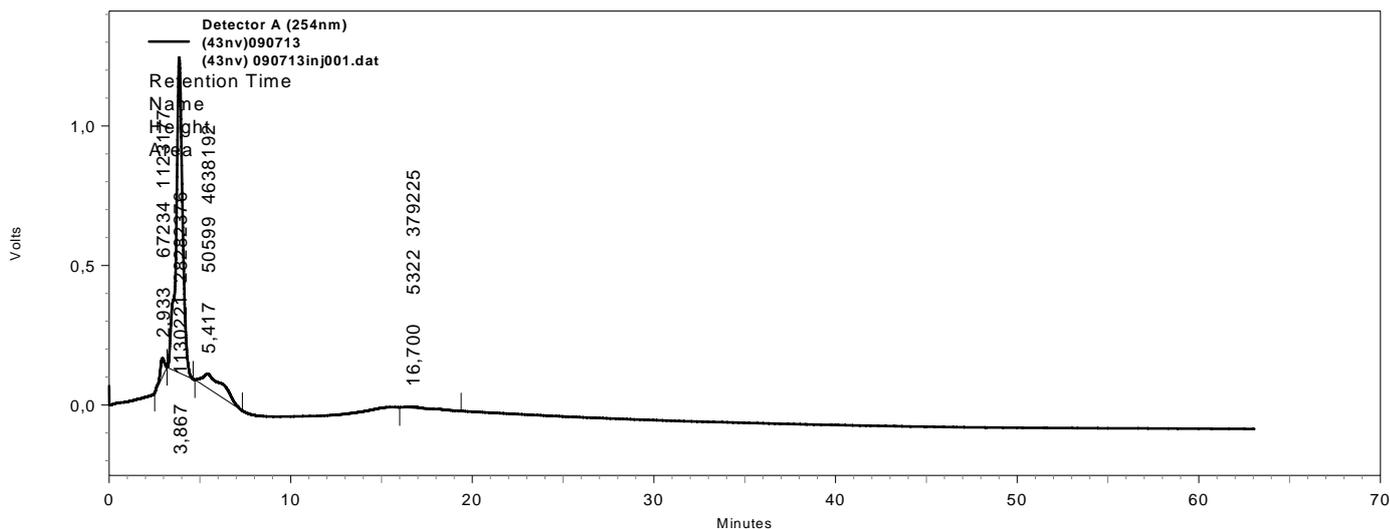
Fichier DATA : C:\WINDOWS\Bureau\ABDELI\43nv) 090713inj001.dat

Conditions d'analyse : Colonne C18

Débit 1,5 ml/mn

Température 25° C

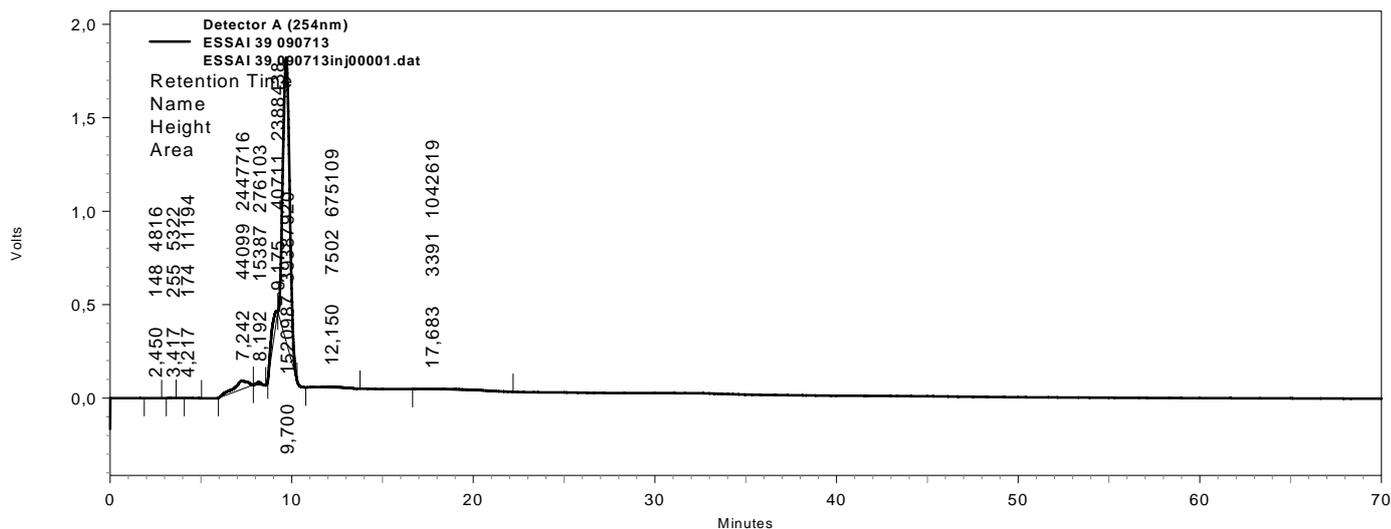
Volume d'injection 20 µl



**Detector A
(220nm)**

	Pk #	Name	Retention Time	Area	Area Percent	Height
1			2,933	1123177	3,26	67234
2			3,867	28282376	82,16	1130221
3			5,417	4638192	13,47	50599
4			16,700	379225	1,10	5322
Totals				34422970	100,00	1253376

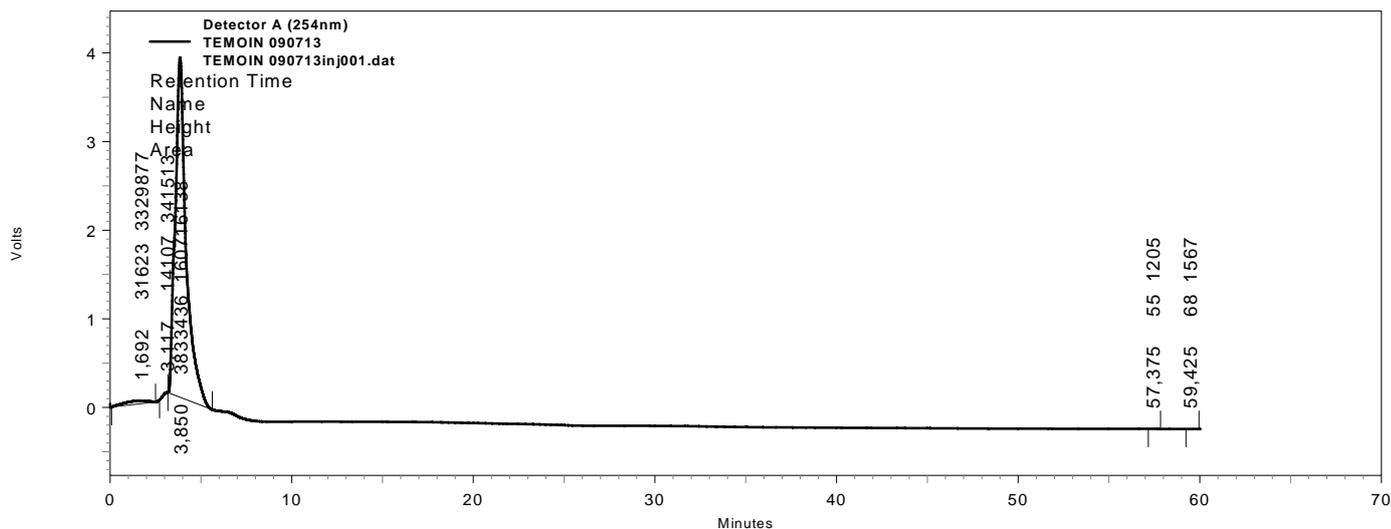
Produit analysé : ESSAI 39 090713
Date d'analyse : 09/07/13 17:27:13
Méthode : C:\CLASS-VP\METHODS\E1.met
Fichier DATA : C:\WINDOWS\Bureau\ABDELI\ESSAI 39 090713inj00001.dat
Conditions d'analyse : Colonne C18
 Débit 1,5 ml/mn
 Température 25° C
 Volume d'injection 20 µl



**Detector A
(220nm)**

Pk #	Name	Retention Time	Area	Area Percent	Height
1		2,450	4816	0,01	148
2		3,417	5322	0,01	255
3		4,217	11194	0,02	174
4		7,242	2447716	5,29	44099
5		8,192	276103	0,60	15387
6		9,175	2388438	5,17	40711
7		9,700	39387920	85,18	1520987
8		12,150	675109	1,46	7502
9		17,683	1042619	2,25	3391
Totals			46239237	100,00	1632654

Produit analysé : TEMOIN 090713
Date d'analyse : 09/07/13 16:24:12
Méthode : C:\CLASS-VP\METHODS\E1.met
Fichier DATA : C:\WINDOWS\Bureau\ABDEL\TEMOIN 090713inj001.dat
Conditions d'analyse : Colonne C18
 Débit 1,5 ml/mn
 Température 25° C
 Volume d'injection 20 µl

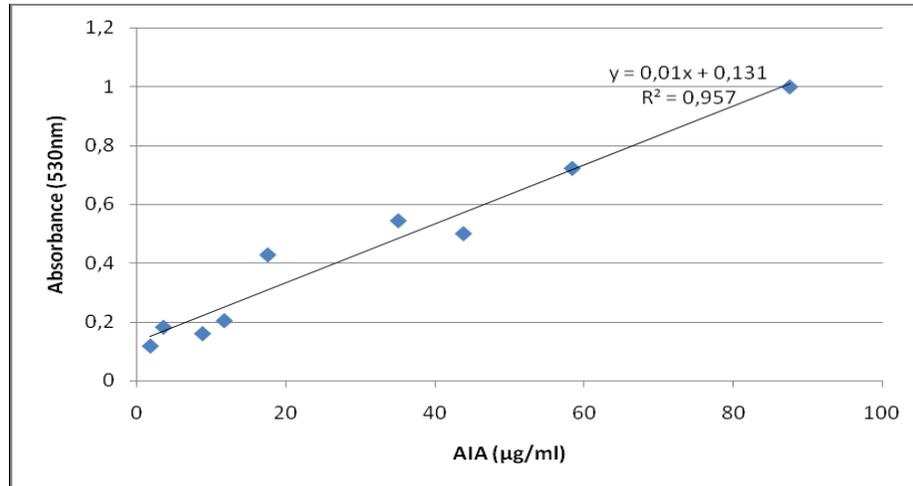


**Detector A
(220nm)**

Pk #	Name	Retention Time	Area	Area Percent	Height
1		1,692	3329877	2,03	31623
2		3,117	341513	0,21	14107
3		3,850	160716138	97,76	3833436
4		57,375	1205	0,00	55
5		59,425	1567	0,00	68
Totals			164390300	100,00	3879289

III. 2 Courbe d'étalonnage

A partir d'une solution de l'AIA (10^{-3} M), les dilutions 2- 3- 4- 5- 10- 15- 20- 50-100 sont effectuées . 1ml de chaque dilution préparée est mélangé à 2 ml de réactif de Salkowski. Après 30 min, la concentration de l'AIA est mesurée par spectrophotométrie à 530nm.



**IDENTIFICATION DE SOUCHES DE *PSEUDOMONAS* FLUORESCENTS ET
APPLICATION DE LEURS LYOPHILISATS POUR LE BIOCONTROLE DE LA
FUSARIOSE VASCULAIRE DE LA TOMATE**

BENOUSSAID Nacéra*¹, BENCHABANE Messaoud¹ et THONART Philippe²

IDENTIFICATION DE SOUCHES DE *PSEUDOMONAS* FLUORESCENTS ET APPLICATION DE LEURS LYOPHILISATS POUR LE BIOCONTROLE DE LA FUSARIOSE VASCULAIRE DE LA TOMATE

BENOUSSAID Nacéra*¹, BENCHABANE Messaoud¹ et THONART Philippe²

1. Laboratoire de Protection et valorisation des ressources biologiques (LPVRB) – Faculté SNV – Université de Blida 1, Algérie.
2. Walloon Center for Industrial Biology (CWBI), Bio-Industry Unit, Agro-Bio Tech, University of Liege, Passage des Déportés, 2-5030 Gembloux; Belgium.

Reçu le 16/02/2018, Révisé le 19/04/2018, Accepté le 29/05/2018

Résumé

Description du sujet : Identification métabolique et moléculaire de souches de *Pseudomonas* fluorescents et application des formes lyophilisées dans le contrôle biologique de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*.

Objectifs. Confirmation de l'identification des souches rhizobactériennes sélectionnées, la production d'inoculum lyophilisé et tester leur efficacité dans le biocontrôle de la fusariose vasculaire de la tomate

Méthodes : 15 souches ayant montré leur efficacité en tant qu'agents de lutte biologique ont fait l'objet d'une identification classique (morphologie, tests physiologiques, biochimiques et Biolog), d'une analyse de l'ARNr 16S et d'un séquençage. Des préparations bactériennes lyophilisées ont été testées *in vitro* et *in situ* vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi*.

Résultats : L'identification phénotypique et génotypique a montré que l'espèce dominante est *P. fluorescens* (50%), en plus de la présence de *P. putida*. Des activités antagonistes importantes, allant de 22.08 % à 54.16 %, ont été enregistrées sur les trois milieux de culture testés (KB, PDA et le mixte KB - PDA). La fusariose vasculaire s'est sensiblement réduite (63%), suite à l'application des lyophilisats bactériens, par rapport aux témoins positifs malades.

Conclusion : Les inoculums lyophilisés présentent une stabilité biologique ayant permis de conserver les potentialités antagonistes des souches sélectionnées.

Mots clés : *Pseudomonas* fluorescents; Identification; Lyophilisats; Biocontrôle; *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*.

IDENTIFICATION OF FLUORESCENT *PSEUDOMONAS* STRAINS AND APPLICATION OF THEIR FREEZE-DRIED IN BIOCONTROL OF TOMATO FUSARIUM VASCULAR WILT

Abstract

Description of the subject: Metabolic and molecular identification of fluorescent *Pseudomonas* strains and application of lyophilised forms in the biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*

Objective: Confirmation of the identification of the selected rhizobacterial strains, the production of freeze-dried inoculum and test their effectiveness in the biocontrol of tomato fusarium vascular wilt.

Methods: 15 strains that have demonstrated efficacy as biological control agents have been classically identified (morphology, physiological, biochemical and Biolog tests), 16S rRNA analysis and sequencing. Lyophilized bacterial preparations were tested *in vitro* and *in situ* against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi*.

Results: Phenotypic and genotypic identification showed that the dominant species is *P. fluorescens* (50%), in addition to the presence of *P. putida*. Significant antagonistic activities, ranging from 22.08 % to 54.16 %, were recorded on the three culture media tested (KB, PDA and the mixed KB - PDA). Vascular fusarium wilt was significantly reduced (63%), following the application of bacterial lyophilisates, compared to the sick positive controls.

Conclusion: The freeze-dried inocula have a biological stability, which has made it possible to preserve the antagonistic potentialities of the selected strains.

Keywords: *Pseudomonas* fluorescents; Identification; freeze-dried inocula; biocontrol; *Fusarium. oxysporum* f.sp. *lycopercisi*.

* Auteur correspondant : Benoussaid Nacera, E-mail : nacerabenoussaid@yahoo.fr

INTRODUCTION

La fusariose vasculaire de la tomate est l'une des maladies les plus dévastatrices sur cette culture à travers le monde. L'agent causal, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, est un champignon tellurique doté d'une spécificité stricte d'hôtes, capable d'envahir l'ensemble du système vasculaire provoquant ainsi son obstruction et par la suite l'affaiblissement de la plante qui finit par mourir [1]. Bien que certaines pratiques culturales soient recommandées, il n'existe aucun traitement chimique efficace pour les plantes infectées et aucune méthode ne permettent de lutter efficacement contre cette maladie. La gestion de cette maladie par des fongicides cause de graves problèmes environnementaux et ils sont également toxiques pour les organismes non ciblés [2, 3]. L'élimination de ces agents pathogènes n'est pas aisée, car leur pouvoir saprophyte et leur aptitude à coloniser les plantes non hôtes leur permettent de survivre même dans les conditions défavorables, ainsi ils sont capables de persister dans le sol infesté pendant plusieurs années en absence de la plante [4].

L'utilisation de certains microorganismes non pathogènes, en tant que biopesticides et/ou biofertilisants, est une technologie émergente et écologiquement compatible, considérée comme alternative prometteuse aux pesticides et engrais de synthèse [5]. En effet, des études ont été menées sur les rhizobactéries (PGPR), connus par leur forte colonisation des rhizosphères des plantes [6], exhibent des potentialités avérées en termes de phytostimulation et de bioprotection des plantes, par le biais d'un large éventail de mécanismes d'action [7, 8]. Globalement, l'effet protecteur conféré par ces agents microbiens est basé sur la compétition pour les nutriments essentiels, sur l'activité antagoniste vis-à-vis de la croissance des pathogènes via la production d'antibiotiques ou d'enzymes et/ou sur leur capacité à stimuler des systèmes de défense chez l'hôte végétal.

Une grande part des recherches réalisée sur les rhizobactéries souligne l'importance et le potentiel du groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents [9]. En effet, au cours des deux dernières décennies, des études ont signalé des augmentations significatives dans la croissance et le rendement des cultures en réponse à l'inoculation avec quelques souches de

Pseudomonas spp. fluorescents [10, 11].

Même si leur utilisation en pratiques agricoles reste limitée, des formulations à base de souches de ces rhizobactéries ont été mises sur le marché international des biopesticides en dépit des difficultés agronomiques et commerciales. De plus le stockage et la conservation de ces inoculums sont souvent délicats [12]. La lyophilisation des *Pseudomonas* spp. fluorescents sous forme de poudre rend plus économique sa conservation, son transport et sa commercialisation [13]. Cette méthode, qui nécessite une congélation, exige des changements assez agressifs en température lors de la conception des formulations microbiennes. Dans certains cas, elle occasionne des altérations cellulaires (peroxydation des acides gras) et génétiques (modification des protéines). L'utilisation de cryoprotecteurs au cours de la lyophilisation et d'antioxydants pendant le stockage augmente sensiblement le taux de viabilité de ces cellules [14].

Le contexte de ce présent travail est de confirmer l'identification de souches de *Pseudomonas* fluorescents par des méthodes classiques (morphologie, tests biochimiques) et moléculaires. Les souches ainsi sélectionnées doivent subir des procédés de lyophilisation pour obtenir des préparations bactériennes applicables directement. Les expérimentations de ces formulations, en qualité de biopesticide, seront vérifiées dans le biocontrôle de l'agent de la fusariose vasculaire de la tomate. Dans ce sens, notre travail a été orienté pour mettre en évidence l'efficacité et la stabilité des préparations après formulation et stockage.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Bactéries antagonistes

Sur la base de leurs caractéristiques métaboliques et de leur potentiel de lutte biologique, 15 souches de *Pseudomonas* fluorescents isolées à partir de sols rhizosphériques de différentes palmeraies et d'arbres fruitiers du sud algérien ont été utilisées dans ce travail. La sélection est en fonction de leur origine et de leur capacité à produire des métabolites impliqués dans le biocontrôle, à savoir les pyoverdines (pvd), l'acide cyanhydrique (HCN) et les phénazines (phz) (Tableau 1).

Tableau 1 : Origine et caractéristiques des souches de *Pseudomonas* fluorescents

Souches	Code BCCM*/ LMG	Plantes hôtes	Origine	Caractéristiques		
				Pvd	HCN	Phz
BB6	ID14047	Palmier dattier	Bechar (Beni Abbas)	+	+	+
BB10	ID14048	Palmier dattier	Bechar (Beni Abbas)	+	+	-
BT3	ID14053	Palmier dattier	Bechar (Taghit)	+	+	-
BT7	ID14054	Palmier dattier	Bechar (Taghit)	+	+	-
BS4	ID14050	Palmier dattier	Bechar (Taghit)	+	+	-
F8	ID14041	Palmier dattier	Ouargla	+	+	-
F20	ID14043	Palmier dattier	Ouargla	+	+	-
F21	ID14055	Palmier dattier	Ouargla	+	+	+
F23	ID14044	Palmier dattier	Ouargla	+	+	-
F19	ID14042	Tomate	Ghardaïa	+	+	-
F27	ID14045	Tomate	Ghardaïa	+	+	-
F48	ID14046	Tomate	Ghardaïa	+	+	-
PI9	ID14051	Poirier	Ghardaïa	+	+	+
PI11	ID14052	Poirier	Ghardaïa	+	+	-
GP4	ID14049	Pommier	Ghardaïa	+	+	-

Pvd : Pyoverdines, HCN : Acide cyanhydrique, Phz : phénazines

*BCCM/ ILMG: Bacteria Collection Laboratorium Voor Microbiologie Universiteit Gent K. Lledeganckstraat 35 B-9000 Gent - Belgium Bccm.

2. Agent pathogène

Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* (FOL, MUCL 43876) fourni par la Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain, Belgique a été utilisé pour les essais d'antagonismes. La suspension fongique a été préparée en cultivant FOL sur PDA (Potato Dextrose Agar) [15] et incubée à 25 °C pendant 7 jours. Le mycélium a été raclé et remis en suspension dans un milieu nutritif liquide et cultivé à 25 °C. La suspension finale a été étalonnée avec du MgSO₄ 10 mM stérile à une concentration de 10⁶ conidies / ml [16]. La pureté a été vérifiée avec des cultures monosporales sur PDA. Les suspensions conidiennes ont été préparées avec des disques de culture fongiques (âgées de huit jours, incubées à 28 °C) et inondées avec 2 ml d'eau distillée stérile. La culture est ainsi raclée et mise en suspension dans 48 ml d'eau distillée stérile. Les suspensions de microconidies obtenues ont été filtrées à travers six couches de gazes stériles, pour séparer le mycélium des conidies, et ajustées par un hématimètre à 10⁶ microconidies / ml [17].

3. Caractérisation et identification des bactéries

En plus de l'identification basée sur le système BIOLOG (BCCM/LMG GENT Belgique),

un séquençage partiel de l'ADNr 16S a été réalisé pour les souches F8 (ID14041), F19 (ID14042), F20 (ID14043), F23 (ID14044), F27 (ID14045), BB6 (ID14047), BS4 (ID14050), PI11 (ID14052) et BT7 (14054). La pureté des cultures bactériennes a été vérifiée sur milieu TSA à 28 °C (BBL 11768).

3.1. BIOLOG, empreinte phénotypique

Une plaque de microtitration (BIOLOG GENIII) a été utilisée pour déterminer les caractéristiques de chaque bactérie à oxyder 71 sources de carbone et à tester sa sensibilité vis-à-vis de 23 substances chimiques. Les résultats ont été interprétés selon les instructions du fabricant (Biolog Inc., Californie USA). Après inoculation, les cultures ont été cultivées pendant 24 heures à 33 °C sur de l'agar Biolog Universal Growth additionné de sang (BUG + B). Une analyse de clusters sur les résultats a été réalisée en utilisant le coefficient de Bray-Curis et UPGMA en utilisant le logiciel BioNumerics (Applied Maths, Belgique).

3.2. Séquençage de l'ADNr 16S et étude phylogénétique

L'ADN a été préparé selon le protocole de Niemann et al. [18]. Le gène de l'ARNr 16S a été amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant les amorces suivantes :

Nom (a) Séquence synonymique (5' → 3')
Position (b)

16F27 pA AGA GTT TGA TCC TGG
CTC AG 8-27
16R1522 pH AAG GAG GTG ATC CAG
CCG CA 1541-1522

(a) F : amorce directe / R: amorce inverse

(b) Position d'hybridation faisant référence à la numérotation des séquences du gène de l'ARNr 16S de *E. coli*.

L'ADNr 16S amplifié par PCR a été purifié en utilisant le kit de nettoyage PCR NucleoFast® 96 (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Les réactions de séquençage ont été réalisées en utilisant le kit de séquençage Cycle BigDye® et purifiées avec le kit de purification BigDye® X TerminatorT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Le séquençage a été effectué en utilisant l'analyseur génétique ABI Prism® 3130XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Les amorces directes et inverses suivantes ont été utilisées pour obtenir un chevauchement partiel des séquences, assurant des données assemblées très fiables :

- Pour 1D14041 à 1D14045: gamma, * gamma, BKL1

- Pour 1D14047, 1D14050, 1D14052 et 1D14054: gamma, * gamma, BKL1, 3

Nom (a) Séquence synonymique (5' → 3')
Position (b)

16F358 * Gamma CTC CTA CGG GAG GCA
GCA GT 339-358
16R339 Gamma ACT GCT GCC TCC CGT
AGG AG 358-339
16R519 BKL1 GTA TTA GCC CGG CTG
CTG GCA 536-516
16R1093 3 GTT GCG CTC GTT GCG GGA
CT 1112-1093

(a) F : amorce directe / R: amorce inverse

(b) Position d'hybridation faisant référence à la numérotation des séquences du gène de l'ARNr 16S de *E. coli*.

L'assemblage des séquences a été réalisé en utilisant le logiciel BioNumerics (Applied Maths, Belgique). Une matrice de similarité a été créée en utilisant le même logiciel par calcul d'homologie avec une pénalité de gap de 0% et après élimination des bases inconnues.

L'analyse phylogénétique a été réalisée après inclusion de la séquence consensus dans un alignement de petites séquences de sous-unités ribosomiques collectées à partir de la bibliothèque de séquences nucléotidiques internationale EMBL (European Molecular Biology Laboratory, www.embl.org). Un arbre phylogénétique a été construit en utilisant la méthode phénétique NJ (neighbour-joining).

4. Formulation

Quatre souches, productrices de quelques métabolites secondaires impliqués dans leurs activités antagonistes, ont fait l'objet d'une formulation au niveau du Centre Wallon de Biologie Industrielle, Unité de Bio-Industrie, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, Belgique. La procédure de formulation a été réalisée sous la direction du Professeur Philippe Thonart, pour l'obtention de préparations bactériennes lyophilisées à des fins de conservation et de stockage. Les lyophilisats obtenus ont été scellés sous vide dans des sachets en aluminium (250 g) et stockés pendant trois années à 4 °C.

5. Activités antagonistes *in vitro*

Le test d'antagonisme *in vitro* a été effectué avec les 4 souches bactériennes de *Pseudomonas fluorescent* lyophilisées vis à vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Le pouvoir antagoniste a été testé sur trois milieux différents : PDA (favorable au développement des champignons), KB (favorable aux *Pseudomonas*) et le milieu mixte PDA-KB (1: 1 v / v). Trois répétitions ont été effectuées pour chaque interaction. La méthode utilisée est celle décrite par Vincent *et al.* [19]. Les souches bactériennes, âgées de 24 h, sont étalées en ligne sur une distance de 1,5 cm à partir des deux bords d'une boîte de Pétri le milieu gélosé. Vingt-quatre heures plus tard et à l'opposé, un disque fongique de 6 mm (âgé de 5 jours) est déposé au centre de la boîte. L'ensemble est incubé à de 28 °C pendant sept à dix jours. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque interaction.

La réduction du diamètre des colonies mycéliennes du champignon pathogène, en présence des souches de *Pseudomonas* comparé au témoin non inoculé, indique la présence d'une activité antagoniste.

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la relation suivante [20] : % d'inhibition = $(R_{\text{témoin}} - R_{\text{test}}) / R_{\text{témoin}} \times 100$. $R_{\text{témoin}}$: distance radicale maximale de la croissance du champignon, R_{test} : distance radicale sur une ligne en direction de l'antagoniste.

6. Essai d'Antagonisme *in situ*

L'étude *in situ*, de l'impact de la lyophilisation et du stockage sur la stabilité des propriétés antagonistes, a été expérimentée avec trois souches (BB6, BB10 et F21) vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* (Fol). Les semences de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Saint Pierre) ont été désinfectées avec l'hypochlorite de sodium à 2° pendant 10 mn, suivie de trois rinçages à l'eau distillée stérile et séchées sur papier filtre stérile. Les graines prégermées ont été transférées dans des pots en plastiques sur un substrat stérilisé (2/3 de tourbe et 1/3 de sol). L'arrosage a été effectué chaque jour avec de l'eau stérile. Au stade 2 à 3 feuilles, les plantules ont été inoculées par des suspensions bactériennes (10^8 UFC/ml). L'inoculation des plantules avec la suspension fongique (10^6 conidies/ml) a été effectuée 48 h après la bactérisation à raison de 2 ml par pot. Les témoins négatifs et positifs ont été traités, respectivement, par l'eau distillée stérile et uniquement par la suspension conidienne de Fol [21].

Le dispositif expérimental adopté est en trois blocs aléatoires complets sous serre en verre (25 – 28 °C). Chaque bloc est composé de onze traitements : plants inoculés respectivement avec les souches lyophilisées BB6, BB10, F21 avec et sans cryoprotecteur en interaction avec Fol; des plants inoculés avec les mêmes souches non lyophilisées (fraichement cultivées 24h) en interaction avec Fol; des plants inoculés uniquement avec la suspension conidienne de Fol et des plants inoculés par l'eau distillée stérile. Chaque traitement est représenté par dix plants par bloc, soit 30 plants par traitement.

Un suivi quotidien des symptômes a débuté 24 h après l'application de la suspension fongique, pendant une période de 60 jours. Le suivi de la progression de la maladie s'est basé sur l'échelle symptomatologique adaptée à la fusariose des plantes herbacées [21]: (0) aucun symptôme, (1) jaunissement unilatéral, (2) jaunissement généralisé, (3) décoloration unilatérale et/ou longitudinale,

(4) flétrissement généralisé, (5) mortalité. L'évolution de la maladie a été estimée par l'incidence de la maladie (taux d'infection) et l'indice de McKinney (gravité) [22, 23].

6.1. Taux d'infection

Le taux d'infection exprime le pourcentage des plants malades (n), par rapport au nombre total des plants (N) examinés [23]. Taux d'infection (%) = $(\sum n / N) \times 100$

6.2. Indice de McKinney (Sévérité)

La sévérité de la fusariose vasculaire a été évaluée par le calcul de l'indice de McKinney [22]. Indice de McKinney (%) = $[\sum (f.v) / N.X] \times 100$, f : classe de l'infection, v : nombre des plants par chaque classe, N : nombre totale des plants observés, X : valeur la plus élevée de l'échelle d'évaluation (5).

7. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de logiciel SYS STAT version 13 (2009). Tous les paramètres analysés ont fait l'objet d'une analyse de variance (ANOVA). Dans les cas où la différence est significative, les moyennes obtenues sont comparés et classées avec le test de Newman-Keuls au risque d'erreur $\alpha = 0,05$ [24].

RÉSULTATS

1. Caractérisation et identification

1.1. BIOLOG, empreinte phénotypique

Les résultats du test de microtitration (BIOLOG GENII) montrent que les souches ID14054, ID14055, ID14053, ID14043, ID14044, ID14046 et ID14050 sont affiliés à *Pseudomonas fluorescens* biotype C. La souche ID14048 est identifiée comme étant *Pseudomonas fluorescens*, mais sans biotypage. Les souches ID14041, D14047 et ID14042 ont été identifiées comme étant *Pseudomonas mendocina*. La souche ID14051 a été identifiée comme *Pseudomona* sp. La souche ID14045 n'a pas été affiliée au genre *Pseudomonas* (Fig. 1).

1.2. Séquençage de l'ADNr 16S et étude phylogénétique

Une similarité significative (> 98,7%) est observée avec plusieurs espèces validées des sous-groupes de *P. gessardi* et *P. fluorescens*, indiquant que les souches ID14054 (BT7), ID14043 (F20), ID14044, (F23) et ID14050 (BS4) appartiennent à l'une de ces espèces. La souche ID14045(F27) a été identifiée comme *P. fluorescens*. Les souches ID14047(BB6), ID140152(PI11), ID14041(F8) et ID14042 (F19) ont été identifiées comme étant *P. putida* (Fig. 2).

2. Activités antagonistes in vitro

Les quatre souches lyophilisées de *Pseudomonas* présentent des activités antagonistes appréciables *in vitro* vis-à-vis de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* sur les trois milieux de culture, induisant des zones d'inhibition limitant la croissance de l'agent pathogène, avec des rapports allant de 22.08 % à 54.16 %. Comparativement au témoin non traité, la croissance mycélienne a diminué de 26,58 à 43,50 % sur PDA, de 43,08 à 54,16 % sur KB et de 22,08 à 43,96 % sur le milieu KB + PDA (Tableau 2).

Tableau 2 : Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne sur les trois milieux

Souches bactériennes	Taux d'inhibition %		
	PDA	KB	Mixte PDA-KB
F21	32,00 (± 1,29)*	54,16 (± 1,89)*	25,83 (± 1,90)*
BB10	43,50 (± 0,90)*	48,34 (± 1,88)*	22,08 (± 0,72)*
BB6	26,58 (± 0,80)*	44,58 (± 1,44)*	23,33 (± 0,72)*
PI9	38,33 (± 1,90)*	43,08 (± 0,63)*	43,96 (± 0,94)*

* : Ecart type issue de trois répétitions

3. Essai d'antagonisme in planta

3.1. Taux d'infection

Les notations individuelles des symptômes, effectuées sur chaque plant, ont permis d'exprimer en pourcentage l'évolution du taux d'infection et l'indice de Mckinney (sévérité) durant 64 jours de suivi.

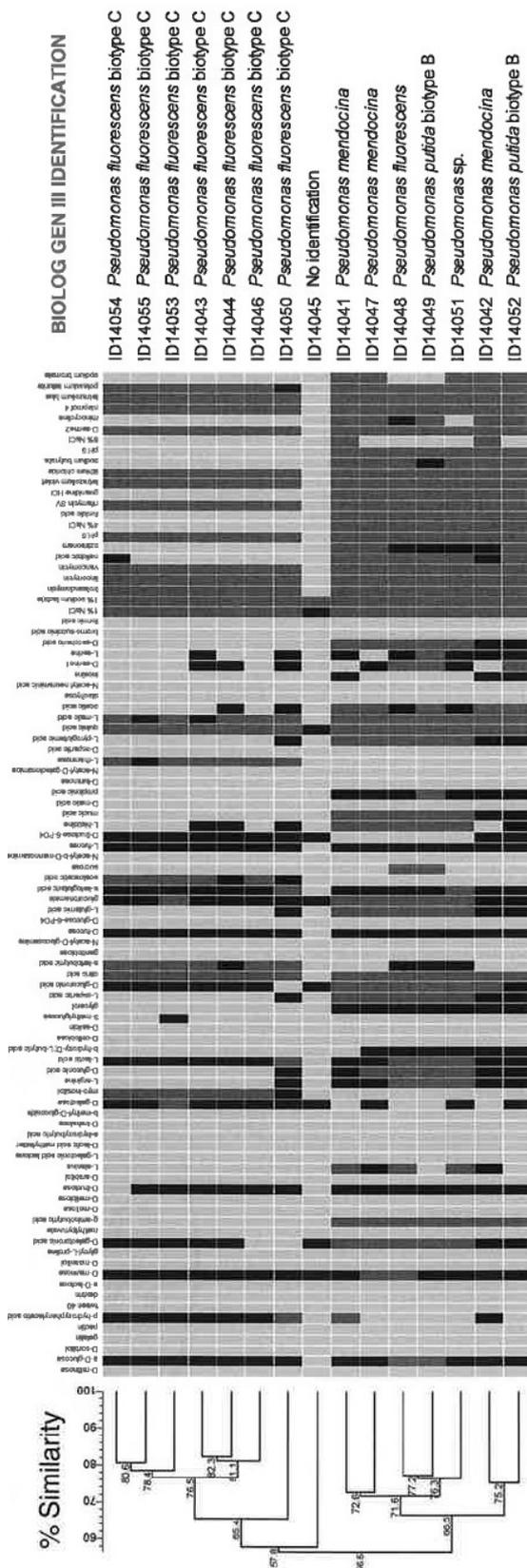


Figure 1 : Affiliation des souches bactériennes en Clusters selon les tests BIOLOG GENIII

L'évolution des taux d'infection chez les plants bactérisés, en présence du pathogène *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, débutent à partir du 25^{ème}, accusant ainsi un retard de trois jours par rapport aux témoins malades. Après cette période, l'ensemble des traitements a

montré une progression rapide pour atteindre leurs maximums respectifs au 32^{ème} jour suivant les opérations des inoculations (85,71 % et 95,24 %). Une stabilité relative, selon les traitements, a été notée à partir du 32^{ème} jour jusqu'au dernier jour de la suivie (Fig. 3).

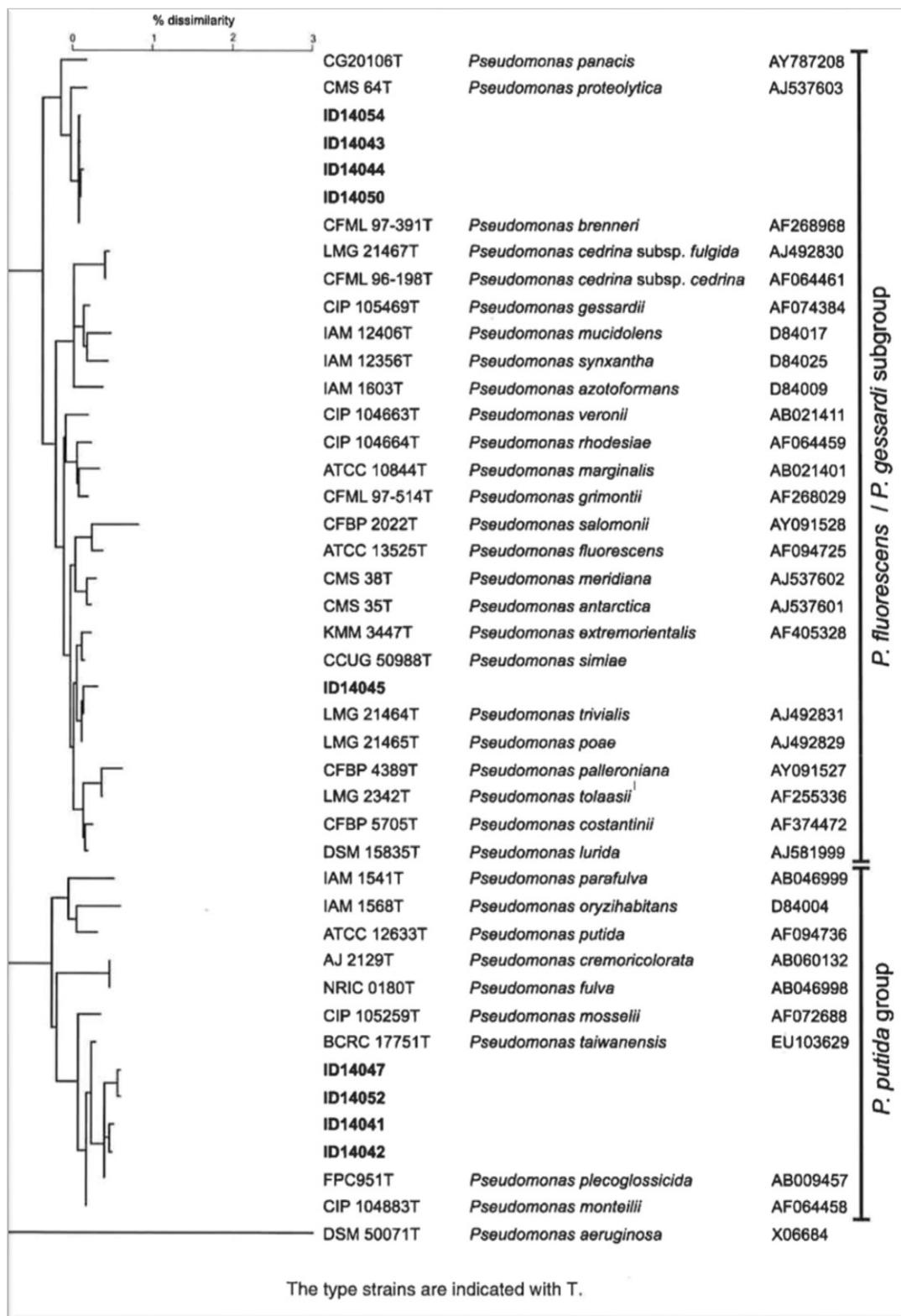


Figure 2: Arbre phylogénétique (ARNr 16S) des espèces validées avec des similarités ≥ 97%

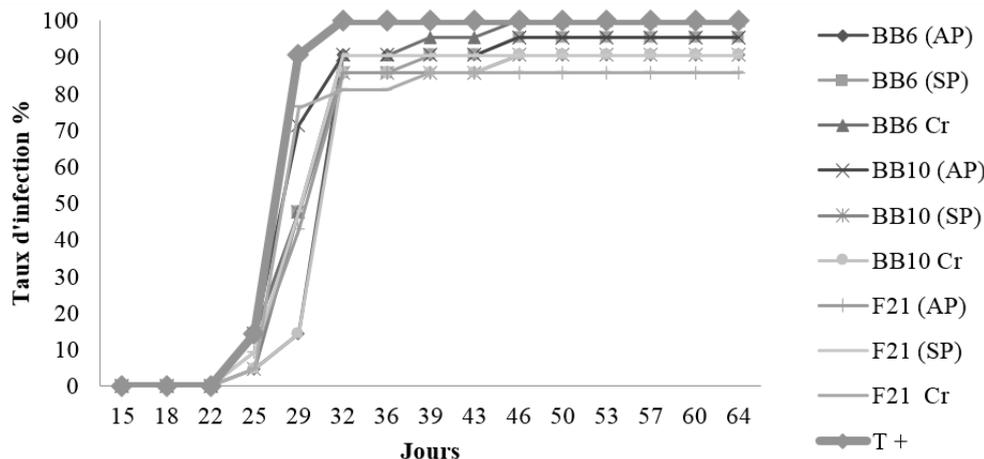


Figure 3 : Evolution des taux d'infection (%)

AP : lyophilisé Avec agent Protecteur, SP : Lyophilisé Sans agent Protecteur, Cr : non lyophilisé

3.2. Sévérité

La figure 4, présente l'évolution de la sévérité (indices de Mckinney) pendant la période d'étude. Les résultats montrent que la sévérité de la fusariose reste faible chez les plants bactérisés par rapport au témoin positif, dès l'apparition de la maladie (25^{ème} jour). Une évolution très faible de la sévérité de l'infection chez les plants bactérisés par rapport au témoin positif a été observée entre les 25^{ème} et 39^{ème} jours après inoculation. Entre les 39^{ème} et 46^{ème} jours, une évolution plus ou moins rapide a été observée chez tous les plants bactérisés, mais qui reste faible par rapport au témoin. Une stabilité remarquable des taux de sévérité a été notée chez tous les traitements bactérisés, avec des taux finaux ne dépassant pas 38 % par rapport au témoin (91%).

Nous signalons, à travers nos résultats, une variabilité de l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* lyophilisés avec et sans protecteurs par rapport aux souches non lyophilisées. Les taux d'infection enregistrés à la fin de notre expérimentation (95,24%) notés chez les plants bactérisés et les indices de Mckinney demeurent par contre faibles, avec un maximum de 38%.

La comparaison entre le taux infection et la sévérité de la maladie (Indice de Mckinney), permet de constater que malgré la progression de la maladie, ces souches antagonistes jouent un grand rôle dans la réduction du degré des symptômes allons jusqu' à 63% chez tous les plants bactérisés par rapport aux témoins positifs où la totalité des plants inoculés sont flétris totalement (mortalité) (Fig. 4).

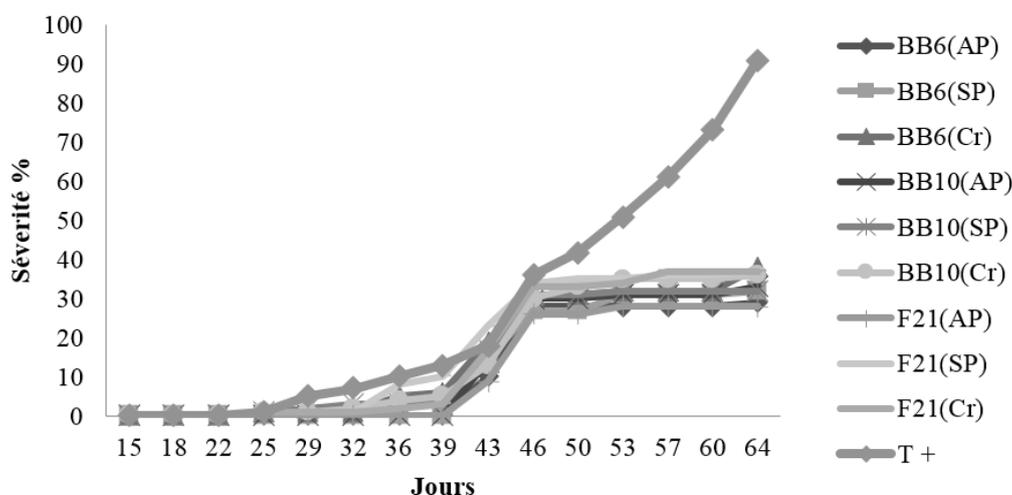


Figure 4: Evolution des indices de Mckinney (%)

AP : lyophilisé Avec agent Protecteur, SP : Lyophilisé Sans agent Protecteur, Cr : non lyophilisé

DISCUSSION

L'utilisation de micro-organismes bénéfiques comme biopesticides, pour réduire les maladies sur diverses plantes d'intérêt agronomique, est considérée comme l'une des méthodes les plus prometteuses dans les pratiques de gestion des cultures. Dans la présente étude, nous avons évalué l'efficacité, *in vivo et in planta*, de souches de *Pseudomonas* fluorescents lyophilisées en tant qu'agents de lutte biologique contre *F. oxysporum* f.sp *lycopersic*.

Les isolements réalisés à partir de sols rhizosphériques, du palmier dattier et d'arbres fruitiers du sud algérien, ont permis de constater la richesse de ce biotope en activité microbienne. Bien que ces rhizobactéries sont ubiquitaires et d'une adaptation relativement facile, ce constat témoigne de la disponibilité de conditions pouvant déterminer des niches écologiques microbiennes. L'hétérogénéité rencontrée dans ces isolements bactériens dénote que la classification des *Pseudomonas* spp. fluorescents reste toujours sujette à beaucoup de divergences. Dans notre étude nous avons noté l'absence d'une concordance entre l'identification taxonomique et les classes phénotypiques. Des constats similaires ont été rapportés dans d'autres travaux [28] qui soulignent les limites des méthodes phénotypiques dans la classification des *Pseudomonas* fluorescents.

Malgré la différence dans la composition chimique du milieu et son influence sur la synthèse des métabolites, qui peuvent avoir une fonction majeure dans l'effet d'inhibition; les trois milieux de culture utilisés ont permis de révéler des activités antagonistes chez les quatre souches bactériennes testées. Nous avons noté que le milieu KB favorisait la synthèse de sidérophores, contrairement aux milieux PD et PD + KB. L'inhibition de la croissance mycelienne observée sur ces deux milieux suggèrent que l'inhibition observée n'était pas due à l'action des sidérophores, mais que d'autres mécanismes ont été développés par les bactéries, contrairement à l'inhibition observée sur les milieux KB, qui peut être corrélée avec la présence des sidérophores.

Il a déjà été démontré que l'action antagoniste de ces mêmes souches ne semblait pas spécifique à l'agent pathogène mais dépendait plutôt du milieu de culture. Dans certains cas, une efficacité à large spectre a été observée,

agissant en même temps sur plusieurs isolats fongiques de différents genres (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium* et *Pythium*) [21]. La variabilité de l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* dans les milieux testés suggère une diversité dans les mécanismes impliqués dans le contrôle biologique [7]. En plus du déterminisme plurifactoriel de l'antagonisme, nos résultats soulignent la possibilité d'une large et non spécifique efficacité contre l'isolat de *F. oxysporum* (Fol). Ces souches rhizobactériennes sont caractérisées par des potentialités variables, en termes de production de métabolites impliqués dans le biocontrôle comme la synthèse de siderophores, de phénazines et de HCN.

Dans l'ensemble, les rhizobactéries les plus actives sont F21, PI9 et BB10 et en dernière position BB6 et leurs activités antagonistes peuvent être corrélées avec leur métabolisme, notamment leurs métabolites secondaires (phénazines). Cependant, l'origine rhizosphérique des souches bactériennes ne semble pas jouer un rôle prépondérant dans leurs activités antagonistes *in vitro* [25].

Malgré l'apparition et l'évolution de l'infection chez tous les traitements étudiés, les situations de bactérisation ont influencé positivement le développement des plants de tomate en réduisant la maladie avec des degrés appréciables. Les plants bactérisés montrent une tolérance à la fusariose vasculaire, se manifestant par un ralentissement de la cinétique de la maladie par rapport aux témoins positifs, qui sont caractérisés par une progression assez rapide et vigoureuse. Chez les plants bactérisés avec les deux souches F21 et BB6, lyophilisées avec cryoprotecteur, la maladie a enregistré une forte réduction, respectivement, de 63% et 62%. La réduction de la sévérité de la maladie causée au cours de notre essai peut s'expliquer par plusieurs mécanismes de bioprotection. Il apparaît clairement que ces mécanismes responsables des effets de certaines souches de *Pseudomonas* reposent sur leurs activités antagonistes par la production des métabolites secondaires à l'encontre des agents phytopathogènes. Il a été déjà confirmé que ces trois souches de *Pseudomonas* (BB6, BB10 et F21) produisent des sidérophores, de l'acide cyanhydrique, des phosphatases, des Phénazines et d'autres enzymes de dégradations de parois cellulaire chez les champignons (protéases, chitinases, cellulases, et pectinases) [17].

Les PGPR antagonistes des champignons phytopathogènes, agissent principalement par la production de métabolites antimicrobiens mais aussi par la compétition pour les niches nutritionnelles rhizosphérique et la stimulation des défenses de l'hôte (résistance systémique induite) [26]. D'autres mécanismes interviennent directement dans la promotion de la croissance des plantes et modulent l'activité bactérienne dans ses activités de bioprotection [27]. La réduction de la maladie peut être le résultat d'une colonisation importante des racines ou des sites de l'infection par ces rhizobactéries bénéfiques, ce qui réduit l'espace nécessaire à la croissance du pathogène [6]. Ces caractéristiques expliquent leur aptitude à s'installer en nombre et durablement sur et à proximité des racines [28]. La colonisation des tissus de la plante joue un rôle primordial dans le biocontrôle [29]. Il a été rapporté que l'application préalable d'un agent biologique inducteur (*Pseudomonas* fluorescents) déclenche ou active les mécanismes de défense latents des plantes, en réponse à l'infection avec les pathogènes [30, 31].

L'utilisation des souches de *Pseudomonas* fluorescents lyophilisées avec ou sans cryoprotection dans le biocontrôle de la fusariose vasculaire de la tomate a donné presque les mêmes résultats qu'avec les souches fraîchement cultivées. A travers nos résultats, nous considérerons que la lyophilisation est une technique préconisée dans le cas des *Pseudomonas* fluorescents vue que c'est une conception appropriée pour la production de cultures bactériennes concentrées, établie pour préserver les microorganismes en gardant leurs viabilités et efficacités avec l'avantage de stabilisation de l'état du matériel biologique séché, pour des éventualités de conservation et de stockage aux températures ambiantes, pour de longues périodes, ajoutant les facilités de transport et de manipulation. Pour que la lyophilisation soit prioritaire et recommandé aux souches de *Pseudomonas* fluorescents, par rapport aux autres traitements physiques préexistants, il est suggéré d'assurer une cryoprotection adéquate avant le processus de lyophilisation.

CONCLUSION

Nos résultats montrent que les souches de *Pseudomonas*, lyophilisées ou non avec ou sans agents protecteurs, présentent des potentialités d'utilisation en tant qu'agents de lutte biologique vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*, agent causal du flétrissement vasculaire de la tomate. Dans notre travail comparativement à d'autres biotopes, il a été constaté une diversité taxonomique (spécifique et intraspécifique) et des aptitudes métaboliques particulières dans le groupe de *Pseudomonas* spp. fluorescents et particulièrement chez les espèces types *P. fluorescens* et *P. putida*.

Les données *in vitro* et *in vivo* soutiennent l'hypothèse que l'antagonisme microbien demeure le principal mécanisme dans le contrôle biologique des maladies. L'effet positif des *Pseudomonas* en générale et spécifiquement lyophilisées en bioprotection est nettement supérieur dans la réduction de la sévérité que la réduction du taux d'infection, indiquant que le biocontrôle rend la plante tolérante à la maladie en réduisant fortement l'évolution et en retardant l'apparition des symptômes.

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- [1]. **Blancard D., Laterrot H., Marchoux G. & Candresse T. (2009).** *Les maladies de la tomate : Identifier, connaître, maîtriser.* Editions Quae, Paris, 690 p.
- [2]. **Bounoua M.D. (2008).** Essais d'utilisation des *Pseudomonas* spp et *Bacillus* spp dans le biocontrôle de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* sur tomate et *Verticillium dahlia* sur l'olivier. Thèse Doctorat, Université d'Essenia, Oran. 202 p.
- [3]. **Ramaiah A.K., Garampalli & Kumar H. (2015).** In vitro antifungal activity of some plant extracts against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5: 22–27.
- [4]. **Snissi A., Ezzouhri B., Rossi D., et Lairini K. (2006).** Contrôle biologique de la fusariose de la tomate causée par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. (ERVBM) Biochimie, Université Abdelmalek Essaadi. Tanger. Maroc. *Substances Naturelles et Environnement*. 352-356.

- [5]. Mahanty M., Bhattacharjee S., Goswami M., Bhattacharyya M., Das B., Ghosh A. and Tribedi P. (2017). Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. *Environmental Science and Pollution Research* 4: 3315–3335
- [6]. Suty L. (2010). La lutte biologique : Vers de nouveaux équilibres écologiques Sciences en partage. Editions Quae, Paris, 328 p.
- [7]. Thomashow L.S. and Weller D.M. (1988). Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis var tritici*. *J Bacteriol* 170: 3499-3508.
- [8]. Sivasakthi S., Usharani G. and Saranraj P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African Journal of Agricultural Research* 25: 1265-1277.
- [9]. Cipriano M. A. P. and Freitas S. S. (2018). Effect of *Pseudomonas putida* on chrysanthemum growth under greenhouse and field conditions. *African Journal of Agricultural Research*. 13(6): 302-310
- [10]. Taguet F., Boisset B.C., Heyraud B.A, Buon L.B. and Kaci Y. (2015). Characterization and structure of the polysaccharide produced by *Pseudomonas fluorescens* strain TF7 isolated from an arid region of Algeria. *C. R. Biologies* .338:335–342
- [11]. Turatto M.F., Dourado F.S., Zilli, J.E. and Botelho, G.R. (2018). Control potential of *Meloidogyne javanica* and *Ditylenchus* spp. Using fluorescent *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. *Brazilian journal of microbiology*. 49: 54–58
- [12]. Digat B. (1994). Les bactéries stimulatrices de la croissance des plantes : le cas des *Pseudomonas*. *C.R.Acad. Agric. fr.* 80 : 125-140. .
- [13]. Mputu Kanyinda J.N., Tshimenga K. and Noki, P. (2015). Accelerated oxidation test of freeze-dried *pseudomonas fluorescens* BTP1, BB2 and PI9 strains. *The Asia Journal of Applied Microbiology*. 2(2): 18-26.
- [14]. Coulibaly I., Dubois-Dauphin R., Destain J., Fauconnier M.L., Lognay G. and Thonart, P. (2010). The resistance to freeze-drying and to storage was determined as the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity. *International Journal of Microbiology*: 1-9.
- [15]. Johnston A. & Booth C. (1983). *Plant Pathologist's Pocketbook*. 2nd Ed. Kew, Commonwealth Mycological Institute. 120p.
- [16]. De Lapeyre B.L., Chillet M. and Chilin-Charles Y. (2008). Measurement of fungicide efficacy on post-harvest diseases: wound anthracnose, quiescent anthracnose, crown rot. *Fruits*, 63: 303–306.
- [17]. Toua D., Benchabane M., Bensaid F. & Bakour R. (2013). Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of fusarium wilt in tomato and flax. *African Journal of Microbiology Research*. 7 (48): 5449-5458.
- [18]. Niemann S., Puehler A., Tichy H.-V., Simon R. et Selbitschka W. (1997). Evaluation du pouvoir de résolution de trois méthodes différentes d'empreintes génétiques pour discriminer les isolats d'une population naturelle de *Rhizobium meliloti*. *Applied Microbiology* 82: 477-484).
- [19]. Vincent M.N., Harrison L.A., Brackin J.M., Kovacevich P.A., Mukerji P. and Weller D.M. (1991). Genetic analysis of the antifungal activity of a soil borne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2928–2934.
- [20]. Gao G., Yin D., Chen Y., Xia F., Yang J., Li Q. and Wang W. (2012). Effect of Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* 2P24 on Soil ungal Community in Cucumber Rhizosphere using T-RFLP and DGGE. *Soil Fungal Com. Cucum. Rhizos.* 7 : 15-26.
- [21]. 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.
- [22]. McKinney H.H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, 26: 195–218.
- [23]. Manikandan R., Saravanakumar D., Rajendran L., Raguchander T. and Samiyappan R. (2010). Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pfl for its efficacy against Fusarium wilt of tomato. *Biological Control*, 54: 83–89.
- [24]. McDonald, J.H. (2009). *Handbook of biological statistics*. 2nd ed. Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland. 320p.
- [25]. Figueroa L.A.M., Cordero R.J.D., Martinez A.J.C., Meyer M.L., Lizarraga S.G.D., Gastelum R.F., Castro M.C. and Maldonado, M.I.E. (2016). *Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of Fusarium erticillioides*. Springer Plus journal, 12 p.

- [26]. **VanLoon, L.C. (2007).** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119 : 243-254.
- [27]. **Hofte M. and Altier N. (2010).** Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Research in Microbiology* 161:464-4
- [28]. **Bossis E., Lemanceau P., Latour X. and Gardan L. (2000).** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* : current status and need for revision. *Agronomie.* 20: 51-63.
- [29]. **Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg G.V., Mulders I.H.M., Dekkers L.C. and Ben J.J. (2000).** Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13: 1340-1345.
- [30]. **Ramamoorthy V., Raguchander T. and Samiyappan R. (2002).** Induction of defense-related proteins in tomato root treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant and soil*, 239 (1): 55-68
- [31]. **Leeman M., Van Pelt J.A., Hendrickx M.J., Scheffer R.J., Bakker, P.A.H.M. and Schippers B. (1995).** Biocontrol of *Fusarium* wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *Phytopathology* 85 : 1301-1305.