

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA 1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DES BIOTECHNOLOGIES

Laboratoire de Protection et Valorisation des Ressources Agro-Biologique



**Mémoire de fin d'études**

En vue de l'obtention du diplôme de Master 2

**Spécialité** : Biotechnologie Microbienne

**THEME**

**Viabilité et Activités antagonistes de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisés vis-à-vis de la fusariose vasculaire.**

**Présenté par**

ZERZOUR Imane

CHERFA Rahima

Soutenu devant le jury :

M <sup>me</sup> BENCHABANE.D	M.A.A	USDB <sub>1</sub>	Président
M <sup>me</sup> BENOUSAID.N	M.A.A	USDB <sub>1</sub>	Promotrice
M <sup>me</sup> AMMAD.F	M.C.A	USDB <sub>1</sub>	Examinatrice
M <sup>lle</sup> MEKHALDI.D	Doctorante	USDB <sub>1</sub>	Invitée

**ANNEE UNIVERSITAIRE: 2017/2018**

# **Introduction**

## Remerciements

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

Nous tenons à remercier infiniment Monsieur le Professeur Benchabane.M, pour nous avoir accordé la chance de travailler au sein de son laboratoire et pour nous avoir fait profiter de ses connaissances. Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude et nos sincères reconnaissances.

Nous voudrions remercier plus particulièrement notre promotrice M<sup>me</sup> Benousaid.N qui nous a régulièrement suivies dans la réalisation pratique de ce travail. Nous la remercions pour son soutien, ses conseils, sa simplicité, sa générosité scientifique et sa qualité humaine.

Nous remercions M<sup>me</sup> Benchabane.D de nous avoir fait l'honneur de présider le jury. Nos remerciements vont également à M<sup>me</sup> Ammad.F et le Doctorante M<sup>lle</sup> Mekhaldi.D d'avoir accepté de participer à ce jury malgré ses nombreuses occupations. Nous leur témoignons toute notre gratitude.

On aimerait exprimer nos plus sincères remerciements à M<sup>me</sup> Fadil.Djamila, ingénieur de laboratoire de Mycologie pour leur disponibilité, pour leurs nombreuses orientations, pour ses conseils avisés et surtout pour leur aide précieuse dans la partie pratique de ce travail.

Nous voudrions témoigner notre reconnaissance à M<sup>me</sup> Krimi.Z pour leur aide au cours de la réalisation de la partie expérimentale au sein du laboratoire de bactériologie. Notre remerciement va également à M<sup>me</sup> Hayat l'ingénieur de laboratoire de microbiologie.

Nous adressons nos remerciements à tous nos enseignants. Nous avons grandement apprécié votre soutien, votre implication et votre expérience, tout au long de notre cursus universitaire.

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

# *Dédicace*

## *Je dédie cet humble travail*

*À mes chers parents,*

*Aucun mot, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect,  
ma considération et l'amour éternel pour les sacrifices que vous avez  
déployés pour mon instruction  
et mon bien être dans les meilleures conditions, votre générosité et votre  
bonté ont toujours été un exemple pour moi.*

*Trouvez en ce travail le fruit de votre dévouement et l'expression de  
ma gratitude et mon profond amour.*

*À mes très chers frères Abdelghani et Mohamed el amine que j'aime  
énormément, en témoignage de la fraternité, avec mes souhaits  
de bonheur de santé et de succès.*

*À tous mes cousins et mes cousines en particulier Wafa, Ryma et Bouchra,*

*À toute la famille Cherfa et Sadok.*

*À mon cher binôme Imane.*

*À mes chères amies Siham, Fella et Fatima zohra.*

*À Tous ceux qui m'ont aidé et soutenu.*

***Rahima***

# *Dédicace*

## *Je dédie ce travail à :*

*Mes très chers parents,*

*pour leurs sacrifices et leurs encouragements ; pour leur soutien  
tout au long de mes études et je remercie DIEU de l'avoir protégé, et je pris  
pour que DIEU les garde pour moi ;*

*À mes très chères frères Adlane, Farid, Fayçal, Ishak et Yakoub  
que j'aime énormément ;*

*À mes très chères belles sœurs Asma et Hanane et mes adorables nièces  
Mohamed, Assil et Yasser ;*

*À mes très chers grands parents que je remercie énormément  
pour leurs soutien et à leurs présences dans ma vie.*

*À toutes la famille Zerzour et Saf: oncles et tantes, cousins et cousines  
et surtout, Samiha, Nesrine et Amina,*

*À mon binôme et sœur Rahima;*

*À mes chères amies Saada, Zineb, Hanane,  
Amina, Soumia, Bouchra et Amel en souvenir de très bon moment  
passé ensemble.*

***Imane***

## Sommaire

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Revue bibliographique</b>	
<b>I-Rhizobactéries</b> .....	3
1-La rhizosphère .....	3
2- Les PGPR.....	4
2-1- Potentiel biotechnologique.....	5
<b>II- <i>Pseudomonas spp.fluorescent</i></b> .....	6
1- Taxonomie .....	6
2- Caractéristiques générales.....	7
3- Applications.....	7
4-Mécanismes d'action.....	8
4-1- Action directes .....	8
4-2- Action indirectes .....	9
5-Formulation et conservation de <i>Pseudomonas fluorescent</i> .....	10
<b>III- La lyophilisation</b> .....	11
1- Impact du séchage sur la viabilité des bactéries .....	12
2- La cryoprotection .....	14
<b>IV- La Fusariose vasculaire</b> .....	15
1- L'agent pathogène.....	15
2- Caractères de l'agent pathogène.....	16
2-1-Caractères physiologique.....	16
2-2- Caractères morphologique.....	17
3-. Cycle évolutif du <i>Fusarium oxysporum</i> .....	18
4- Fusariose vasculaire de la tomate.....	19
5-Fusariose vasculaire de palmier dattier.....	19
6-Fusariose vasculaire de lin.....	20
<b>V- La lutte contre les fusarioses vasculaires</b> .....	21
1-lutte culture.....	21
2-lutte agronomique.....	21
3-lutte génétique.....	22
4-lutte chimique.....	22
5-lutte biologique.....	22
<b>Matériel et méthodes</b>	
1- Souches bactériennes.....	23
2- Souches fongique.....	23
<b>I- Etude de viabilité de <i>Pseudomonas.spp</i> fluorescents lyophilisées avec et sans protecteurs</b> .....	23
Purification des souches bactériennes.....	25
<b>II- Efficacité des souches de <i>Pseudomonas.spp</i> fluorescent lyophilisées</b> .....	26
<b>1-Mise en évidence de la production de quelques métabolites secondaires impliqués dans le biocontrôle et la phytostimulation</b> .....	25
1-1-Production de sidérophores .....	26
1-2-Synthèse de l'acide indole acétique (AIA).....	26
1-3- Synthèse des antibiotiques.....	27
1-3- 1-Production l'acide cyanhydrique (HCN).....	27
1-3- 2-Production de phénazine.....	27
1-4- Production des enzymes.....	28

1-4-1-phosphatase .....	28
1-4-2- Les enzymes dégradant les parois cellulaires (CWDE) .....	28
1-4-2-1- Enzymes protéolytiques.....	28
1-4-2-2- Chitinases.....	28
1-4-2-3- Activité amylolytique.....	28
1-5- Production d'ammoniac (NH <sub>3</sub> ) .....	29
<b>2- Test d'activité antagoniste des quatre souches de <i>Pseudomonas.spp</i> fluorescents lyophilisées vis-à-vis trois souches fongiques de <i>Fusarium oxysporum</i> en comparaison avec les mêmes souches non lyophilisées .....</b>	<b>29</b>
2-1- Purification des souches fongiques.....	29
2- 2- Potentialités Antagonistes <i>in vitro</i> des lyophilisats .....	29
<b>Résultats et discussion</b>	
<b>I- Détermination de viabilité de <i>Pseudomonas.spp</i> fluorescents lyophilisées avec et sans protecteurs .....</b>	<b>31</b>
<b>II- Etude d'efficacité des souches de <i>Pseudomonas.spp</i> fluorescent lyophilisées .....</b>	<b>32</b>
<b>1- Production de quelques métabolites secondaires impliqués dans le biocontrôle et la phytostimulation.....</b>	<b>32</b>
1-1- Production des métabolites secondaires.....	33
1-1-1-Production de sidérophores .....	33
1-1- 2-Synthèse de l'acide indole acétique (AIA).....	34
1-1-3- Synthèse des antibiotiques.....	36
1-1-3- 1-Production l'acide cyanhydrique (HCN).....	36
1-1-3- 2-Production de phénazine.....	38
1-1-4- Production des enzymes.....	38
1-1-4-1-phosphatase .....	38
1-1-4-2- Les enzymes dégradant les parois cellulaires (CWDE) .....	40
1-1-4-2-1- Enzymes protéolytiques.....	40
1-1-4-2-2- Chitinases.....	41
1-1-4-2-3- Activité amylolytique.....	41
1-1-5- Production d'ammoniac (NH <sub>3</sub> ) .....	42
<b>2-Resultats de l'activité antagoniste in vitro des souches bactériennes de <i>Pseudomonas spp.</i> fluorescents. ....</b>	<b>43</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>52</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

## **Viability and antagonistic activity of *Pseudomonas* spp. fluorescent lyophilized vis-a-vis fusarium wilt.**

### **Abstract**

Our work aims to determine the effect of lyophilization and cryoprotection on the viability and activity of *Pseudomonas* spp. fluorescent, biocontrol agent for fusarium wilt during storage.

The first part of our work concerns the study of the viability of four freeze-dried *Pseudomonas* spp. fluorescent strains with and without protectors (F21, BB10, BB9 and PI9) after 5 years of storage at 4 ° C by methods of namely direct counting on a Petri dish. Petri dish count results show that strains of *Pseudomonas* spp. fluorescent have diminished their viability after 5 years of drying. The survival rate varies between 2.84% and 32.27% recorded respectively by lyophilized BB10 and PI9 strains with protector and between 4.27% and 25.21% recorded respectively with the lyophilized BB9 and F21 strains without protector.

The second part deals with the efficacy study of the four strains of *Pseudomonas* spp. fluorescent lyophilized in comparison with non-lyophilized (F21, BB10, BB9 and PI9), by the test of the power of production of some secondary metabolites. The four strains of *Pseudomonas* spp. Fluorescent assays exhibited an ability to produce secondary metabolites implicated in phytostimulation (Acid indol acetic, phosphatase) and biocontrol (hydrogen cyanid, phenazine, enzyme degrading such as chitinase, protease, amylase...) , hydrogen cyanid and chitinase production was absent in all four lyophilizates.

The study of the efficacy of the four strains of *Pseudomonas* spp. fluorescence in pathogen inhibition was achieved by the direct confrontation method with three fungal strains of *Fusarium oxysporum* (*Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f sp *lini* and *Fusarium oxysporum* f sp *albedinis*). This method made it possible to highlight antagonistic potentialities in vitro, variable against the three fungal strains on the three culture media examined (King B, Potato Dextrose Agar and Mixed). The best result was obtained by the F21 strain vis-à-vis Folin with an inhibition rate of 55.15% on the King B medium.

**Key words:** Rhizobacteria, *Pseudomonas* spp. fluorescent, *Fusarium oxysporum*, lyophilization, cryoprotection.

# Viabilité et activité antagoniste de *Pseudomonas* spp. fluorescent lyophilisés vis-à-vis de la fusariose vasculaire.

## Résumé

Notre travail a pour but de déterminer l'impact de la lyophilisation et la cryoprotection sur la viabilité et l'activité de *Pseudomonas* spp. fluorescent, agent de biocontrôle de la fusariose vasculaire pendant la conservation.

La première partie de notre travail porte à l'étude de la viabilité de quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent lyophilisées avec et sans protecteurs (F21, BB10, BB9 et PI9) après 5 ans de conservation à 4°C par la méthode de dénombrement direct sur boîte de Pétrie. Les résultats de dénombrement sur boîte de Pétrie montrent que les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent ont diminué leur viabilité après 5 ans de séchage. Le taux de survie varie entre 2.84% à 32.27% enregistrés respectivement par les souches BB10 et PI9 lyophilisées avec protecteur et entre 4.27% à 25.21% enregistrés respectivement avec les souches BB9 et F21 lyophilisées sans protecteur.

La deuxième partie, porte sur l'étude de l'efficacité des quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent lyophilisées en comparaison avec les souches non lyophilisées (F21, BB10, BB9 et PI9), par le test du pouvoir de production de quelques métabolites secondaires. Les quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent testées ont présenté une capacité à produire des métabolites secondaires impliqué dans la phytostimulation (Acide Indole Acétique et phosphatase) et dans le biocontrôle (Cyanid d'hydrogène, Phénazine et les enzymes telles que le protéase, amylase...). La production de Cyanid d'hydrogène et de chitinase est absentes chez les quatre lyophilisats.

L'étude de l'efficacité des quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent dans l'inhibition de l'agent pathogène a été réalisé par la méthode de confrontation directe vis-à-vis trois souches fongiques de *Fusarium oxysporum* (*Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f sp *lini* et *Fusarium oxysporum* f sp *albedinis*). Cette méthode a permis de mettre en évidence des potentialités antagonistes *in vitro*, variable contre les trois souches fongiques sur les trois milieux de culture examinés (King B, Potato Dextrose Agar et Mixte). Le meilleur résultat a été obtenu par la souche F21 vis-à-vis Foln avec un taux d'inhibition de 55.15% sur le milieu King B.

**Mots clés :** Rhizobactéries, *Pseudomonas* spp. fluorescent, *Fusarium oxysporum*, lyophilisation, cryoprotection.

## Liste des figures

Figures	Titre	Page
<b>Figure 01</b>	Diagramme d'une racine et structure de la rhizosphère	<b>3</b>
<b>Figure 02</b>	Mécanismes phytobénéfiques des PGPR dans la rhizosphère	<b>5</b>
<b>Figure 03</b>	Les caractéristiques morphologiques de <i>Fusarium oxysporum</i> (A) microconidies; (B) macroconidies ; (C) microconidies produites par monophialides; et (D) une seule chlamydospore terminale.	<b>17</b>
<b>Figure 04</b>	Cycle de vie de <i>fusarium oxysporum</i> .	<b>18</b>
<b>Figure 05</b>	Les symptômes de la flétrissure fusarienne a) Jaunissement et flétrissement unilatéral des folioles et des feuilles de la tomate b) Brunissement longitudinal de la tige c) Une coupe longitudinale de la tige montrant le brunissement des vaisseaux.	<b>19</b>
<b>Figure 06</b>	Les symptômes de Bayoud apparaissent sur une ou plusieurs feuilles de couronne centrale	<b>20</b>
<b>Figure 07</b>	La palme meurt lorsque le bourgeon terminal est atteint	<b>20</b>
<b>Figure 08</b>	a) Deux semis de lin montrant une flétrissure partielle, avec tige principale infectée et en bonne santé tige latérale, b) flétrissement unilatéral d'une plante de lin où les feuilles d'un côté sont flétries, tandis que l'autre côté est exempt de maladie.	<b>21</b>
<b>Figure09</b>	Les souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents après lyophilisation	<b>24</b>
<b>Figure10</b>	Réhydratation et étalement de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents lyophilisés	<b>24</b>
<b>Figure11</b>	Vérification des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents lyophilisés après plusieurs repiquages	<b>25</b>
<b>Figure 12</b>	Vérification des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents non lyophilisés après plusieurs repiquages	<b>25</b>
<b>Figure 13</b>	Vérification des souches de <i>Fusarium oxysporum</i>	<b>29</b>
<b>Figure14</b>	Ensemencement des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents sous forme de deux stries parallèles	<b>30</b>
<b>Figure15</b>	Transplantation d'un disque fongique au centre de boîte de pétrie contient la souche de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents	<b>30</b>
<b>Figure 16</b>	Evolution des concentrations des quatre souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescent avant, et après 3 ans et après 5ans de la conservation à 4°C	<b>31</b>
<b>Figure17</b>	Aspect des colonies de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents	<b>31</b>
<b>Figure18</b>	Production des sidérophores par les <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents	<b>33</b>
<b>Figure19</b>	Production de de l'acide-indole-acétique parla souche BB10 de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents. T : Temoin. L : lyophisées. NL : non lyophilisées	<b>34</b>
<b>Figure20</b>	Production d'autres types d'AIA par quelques souches <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescent	<b>34</b>
<b>Figure 21</b>	Production de l'acide-indole-acétique par <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents sur milieu liquide	<b>35</b>
<b>Figure 22</b>	Production d'HCN par les souches non lyophilisés	<b>36</b>
<b>Figure 23</b>	Absence de production d'HCN par les souches lyophilisées	<b>36</b>

<b>Figure 24</b>	Forte production de phosphatase par <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents lyophilisées. (T) : Témoin.	<b>38</b>
<b>Figure 25</b>	Faible production de phosphatase par <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents lyophilisées	<b>39</b>
<b>Figure 26</b>	Production de phosphatase par <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents non lyophilisées. (T) : Témoin	<b>39</b>
<b>Figure27</b>	Production des enzymes protéolytiques par <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents lyophilisées	<b>40</b>
<b>Figure 28</b>	Production d'amylase par la lyophilisat PI9. T : Témoin.	<b>41</b>
<b>Figure 29</b>	Production d'NH <sub>3</sub> par toutes les souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents	<b>42</b>
<b>Figure30</b>	Le taux d'activité antagoniste des quatre souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescent non lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de Fusarium sur milieu PDA	<b>43</b>
<b>Figure 31</b>	Le taux d'activité antagoniste des quatre souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescent lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de Fusarium sur milieu PDA.	<b>43</b>
<b>Figure 32</b>	Activité antagoniste de la souche F21 lyophilisée vis-à-vis F.o.a sur milieu PDA	<b>44</b>
<b>Figure 33</b>	Activité antagoniste de BB10 et BB9 vis-à-vis F.o.l sur milieu PDA. <b>L</b> : lyophilisée. <b>NL</b> : non lyophilisée	<b>44</b>
<b>Figure 34</b>	Activité antagoniste de lyophilisat F21, BB9 et BB10 vis-à-vis F.o.ln sur milieu PDA. <b>L</b> : lyophilisée. <b>NL</b> : non lyophilisée.	<b>44</b>
<b>Figure 35</b>	Le taux d'activité antagoniste des quatre souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescent non lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de Fusarium sur milieu KB	<b>45</b>
<b>Figure 36</b>	Le taux d'activité antagoniste des quatre souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescent lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de Fusarium sur milieu KB	<b>45</b>
<b>Figure 37</b>	Activité antagoniste de la souche BB9 et F21 vis-à-vis Foa sur milieu KB. <b>L</b> : lyophilisée. <b>NL</b> : non lyophilisée.	<b>46</b>
<b>Figure 38</b>	Activité antagoniste de la souche F21, BB10 et PI9 vis-à-vis Fol sur milieu KB. <b>L</b> : lyophilisée. <b>NL</b> : non lyophilisée.	<b>46</b>
<b>Figure 39</b>	Activité antagoniste de la souche F21 et PI9 vis-à-vis Foln sur milieu KB. <b>L</b> : lyophilisée. <b>NL</b> : non lyophilisée.	<b>46</b>
<b>Figure 40</b>	Le taux d'activité antagoniste des quatre souches <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescent non lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de Fusarium sur milieu mixte	<b>47</b>
<b>Figure 41</b>	Le taux d'activité antagoniste des quatre souches <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescent lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de Fusarium sur milieu mixte.	<b>47</b>
<b>Figure 42</b>	Activité antagoniste de la souche BB9 et PI9 vis-à-vis F.o.a sur milieu mixte. <b>L</b> : lyophilisée. <b>NL</b> : non lyophilisée	<b>48</b>
<b>Figure 43</b>	Activité antagoniste de la souche BB10 et PI9 vis-à-vis F.o.l sur milieu mixte. <b>L</b> : lyophilisée. <b>NL</b> : non lyophilisée	<b>48</b>
<b>Figure 44</b>	Activité antagoniste de la souche F21 vis-à-vis F.o.ln sur milieu mixte. <b>L</b> : lyophilisée. <b>NL</b> : non lyophilisée	<b>48</b>

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide desoxyrebose nucleotidique

**ACC** : Aminocyclopropane Carboxylat

**ARN** : Acide rebosomique nucleotidique

**ARN** : Acide ribonucléique ribosomique

**Cd** : Cadmium

**Cfu** : Colony Forming Unit

**Cm** : Centimètre

**DO** : Densité Optique

**F** : Fusarium

**Fe<sup>+2</sup>** : fer ferreux

**Fe<sup>+3</sup>** : fer ferrique

**Fig:** figure

**f.sp** : forme Spécial

**g** : Gramme

**HCN** : Cyanure d'hydrogène

**KB** : King B

**L** : Litre

**Mm** : Millimètre

**Mm** : Micromètre

**Mol** : Mole

**Mmol** : Millimole

**N<sub>2</sub>**: Diazote

**NH<sub>3</sub>**: Ammoniac

**NO<sup>-3</sup>** : Nitrate

**P:** Phosphate

**P.:** Pseudomonas

**Pb:** Plomb

**PDA:** Potato Dextrose Agar

**PGPR** : Plant growth promoting rhizobacteria

**pH**: Potentiel Hydrogène

**Rpm** : Rotation par minute

**UV** : Ultraviole

**Zn** : Zinc

**°C** : Degré Celsius

**%** : Pourcentage.

**2,4-DAPG** : 2-4 diacétylphloroglucinol

## Liste des tableaux

<b>Tableaux</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 01</b>	Qualités phytobénéfiques de quelques PGPR	<b>6</b>
<b>Tableau 02</b>	Les différents microorganismes utilisés en lutte biologique.	<b>22</b>
<b>Tableau 03</b>	Le taux de survie des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescent lyophilisés avant et après 3ans de stockage	<b>25</b>
<b>Tableau 04</b>	Le taux de viabilité des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescent avant et après la conservation.	<b>31</b>
<b>Tableau 05</b>	Production de métabolites secondaires par les souches de <i>Pseudomonas</i> spp. Fluorescents	<b>33</b>
<b>Tableau 06</b>	Production qualitative et quantitative d'Acide Indole Acétique (AIA) chez les souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents lyophilisées et non lyophilisées	<b>34</b>

### **Introduction**

Sur terre, les microorganismes ont colonisé à peu près tous les écosystèmes (**Saharan et al., 2011**). Dans le sol, les champignons phytopathogènes constituent la première barrière biotique pouvant affecter le rendement agricole. Ils sont capables de s'adapter très rapidement à des modifications de leur environnement comme par exemple développer des résistances à la plupart des pesticides récents (**Ashraf et al., 2012 ; Choudhary et Virma, 2016**).

L'utilisation des pesticides chimiques offre généralement une protection efficace contre les maladies fongiques des cultures. Leur efficacité est relativement peu durable à cause de l'adaptation rapide de ces populations pathogènes, la pollution et la contamination des aliments et de l'environnement qui soulève une grave préoccupation. Pour cela, la lutte biologique semble être une alternative fiable qui peut fournir une sécurité écologique et une protection à long terme à la culture (**Kumar et al., 2016 ; Patil et al., 2016**).

Parmi les microorganismes à effets bénéfiques, il existe des bactéries dont l'effet global favorise la croissance des plantes qui sont connues sous le terme PGPB (plant growth promoting bacteria) (**Grobelak et al., 2014**). Elles peuvent favoriser la croissance des plantes et leur développement par des moyens directs ou indirects. Les premiers en facilitant la croissance végétale des plantes sous des conditions de stress biotique ou abiotique. Les seconds par le biocontrôle, par lequel les bactéries évitent les effets nuisibles des phytopathogènes (**Patil et al., 2016 ; Singh et al., 2016**).

Parmi les microorganismes expérimentés avec succès, à l'égard des maladies d'origine tellurique, les *Pseudomonas* spp. fluorescents (**Armstrong et Armstrong, 1981 et Benchabane, 2005**). Les rhizobactéries du groupe *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été largement utilisées dans le biocontrôle des pathologies végétales d'origine tellurique vis-à-vis des trachémycoses provoquées par *Fusarium oxysporum*. Plusieurs souches de ce groupe bactérien ont été expérimentées avec succès contre de nombreuses formes spéciales de ce pathogène (**Benchabane et al., 2011**). Elles exercent leur activité antagoniste au moyen de différents mécanismes incluant l'antibiose. Chez les *Pseudomonas*, l'antibiose implique plusieurs molécules antifongiques telles que la phénazine, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine et le 2,4-diacétylphloroglucinol, pour ne citer que les plus importantes (**Haas et Defago, 2005**).

Pour assurer une conservation optimale, compatible avec la préservation d'une viabilité maximale, et rendre ainsi le stockage, le transport et la commercialisation des microorganismes plus économique, le séchage des microorganismes a pour ce but (**Mputu et al., 2014**). La lyophilisation des bactéries en général et des *Pseudomonas* spp en particulier (**Mputu et al., 2014**), permet d'obtenir une déshydratation poussée compatible avec des durées de conservation

très longues. Cette méthode implique des changements de la température du produit assez agressifs pour les microorganismes car elle nécessite une congélation. Dans certains cas, elle occasionne des altérations cellulaires et génétiques. L'utilisation des cryoprotecteurs au cours de la lyophilisation et d'antioxydants pendant le stockage augmente sensiblement le taux de viabilité de ces cellules (Coulibaly *et al.*, 2010).

Dans ce sens que notre travail a été orienté dans le but de mettre en évidence l'effet de la conservation par la lyophilisation sur la viabilité, l'efficacité et la stabilité de l'expression des effets antagonistes des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents vis -à- vis des souches de *Fusarium oxysporum* agent de la fusariose vasculaire. A cet effet, notre travail a été réalisé en deux parties :

- I. Détermination la viabilité des souches de *Pseudomonas*.spp fluorescents après lyophilisation et conservation à 4°C pendant 5 ans avec et sans protection.
- II. Etude de l'efficacité des souches de *Pseudomonas*.spp fluorescent lyophilisées par :
  - 1- Mise en évidence de la production de quelques métabolites secondaires par les souches de *Pseudomonas*.spp fluorescents lyophilisées et non lyophilisées.
  - 2- Evaluer l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas*.spp fluorescents lyophilisées vis-à-vis trois souches de *Fusarium oxysporum* en comparaison avec les mêmes souches non lyophilisées.

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Mycologie de Département de Biotechnologie de l'Université Blida 1, il comprend deux parties:

- I. Détermination la viabilité des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents après lyophilisation et conservation à 4°C pendant 5 ans avec et sans protection.
- II. Etude d'efficacité des souches de *Pseudomonas*.spp fluorescent par :
  - 1- Mise en évidence de la production de quelques métabolites secondaires par les mêmes souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisées.
  - 2- Evaluer l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisées vis-à-vis 3 souches de *Fusarium oxysporum* en comparaison avec les mêmes souches non lyophilisées.

## I- Matériels biologiques

### 1- Souches bactériennes

Dans notre étude nous avons utilisé quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (BB9, BB10, F21, PI9) isolées à partir de la rhizosphère de quelques arbres fruitiers de sud Algérien, identifiées et lyophilisées au Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI) au Belgique, avec et sans agents protecteurs (Glycérol + Maltadextrine) (Mputu *et al.*, 2012). Ces souches appartiennent à la collection du laboratoire de Mycologie (département de Biotechnologie l'université Blida1).

### 2- Souches fongiques

Pour évaluer l'activité antagoniste des souches bactériennes précédemment citées, nous avons utilisé trois formes spéciales de *Fusarium oxysporum* (*Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f sp *lini* et *Fusarium oxysporum* f sp *albedinis*). Ces souches fongiques appartiennent à la collection du laboratoire de Mycologie (Département de Biotechnologie l'Université Blida1).

## II- Méthode

### A-Etude de la viabilité de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisées avec et sans protecteurs

La viabilité a été évaluée après conservation à 4°C pendant 5ans selon la méthode du dénombrement direct sur milieu solide.1g de chaque lyophilisat a été réhydraté dans un tube à essai contient 9ml d'eau distillée stérile. Une série de dilution ( $10^{-1}$  à  $10^{-9}$ ) a été réalisé pour chaque suspension bactérienne préparée. 0,1 ml de chaque dilution a été prélevée à l'aide d'une

pipette ensuite étalée sur un milieu KB (**King et al., 1954**) (Annexe 03) (fig 09). Trois répétitions ont été effectuées pour chaque dilution. Après incubation à 28°C pendant 24 h, les colonies bactériennes ont été dénombrées par un compteur de colonie.



**Figure 09** : Les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents après lyophilisation.



**Figure 10** : Réhydratation et étalement de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisées.

La viabilité des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents a été déterminée avant et après conservation (Tableau 03). Le nombre de colonies a été compté après 24 heures d'incubation et le taux de survie a été exprimé en Unités Formant Colonies (UFC) par g après conservation (Nf) et avant la conservation (N0) (**Coulibaly et al., 2009**) par le rapport :

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

Chaque résultat est la moyenne géométrique d'au moins trois répétitions (**Coulibaly et al., 2009**) (Tableau02, Annexe02).

**Tableau 03** : Le taux de survie des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent lyophilisés avant et après 3ans de stockage.

Souches	Avant stockage (cfu/g)		Après 3 ans de stockage à 4°C (cfu/g)	
	AP	SP	AP	SP
<b>BB<sub>9</sub></b>	4,00.10 <sup>9</sup>	1,43.10 <sup>10</sup>	9,00.10 <sup>8</sup>	7,37.10 <sup>8</sup>
<b>BB<sub>10</sub></b>	3,80.10 <sup>10</sup>	6,40.10 <sup>9</sup>	9,30.10 <sup>9</sup>	8,50.10 <sup>8</sup>
<b>F<sub>21</sub></b>	6,33.10 <sup>9</sup>	3,53.10 <sup>9</sup>	7,77.10 <sup>8</sup>	8,90.10 <sup>8</sup>
<b>PI<sub>9</sub></b>	2,2. 10 <sup>11</sup>	/	7,1.10 <sup>10</sup>	/

AP : Avec protecteur ; SP : Sans protecteur ; / : Absence de souche.

### ➤ Purification des souches bactériennes

#### • Les souches lyophilisées

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

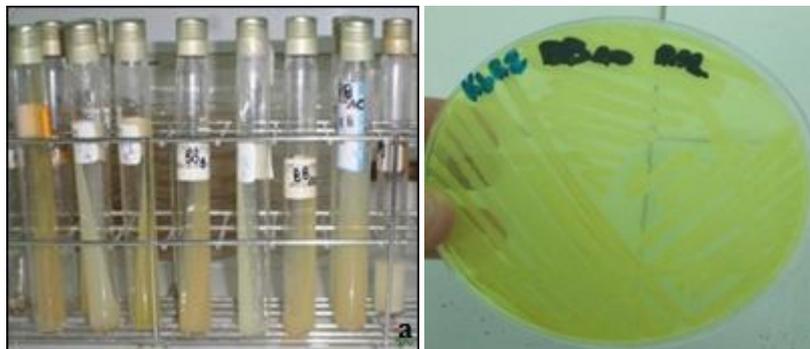
La pureté des souches bactériennes a été vérifiée en réalisant plusieurs repiquages successifs (fig 11). La production d'un pigment fluorescent a été notée par la présence d'une couleur verdâtre visible à l'œil nu après 24h d'incubation à 28°C (**Meyer et Abdallah, 1978**).



**Figure 11** : Vérification des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisées après plusieurs repiquages.

#### • Les souches non lyophilisées

Les souches bactériennes non lyophilisées (à l'état fraîche) (fig 12 a) ont été repiquées sur boîtes de Pétri contenant le milieu King B (Annexe 03) de façons successive jusqu'à l'obtention de culture pures (fig 12).



**Figure 12:** Vérification de la pureté des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents non lyophilisées (à l'état frais).

## **B- Efficacité des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent lyophilisées**

### **B-1- Mise en évidence de la production de quelques métabolites secondaires impliqués dans le biocontrôle et la phytostimulation**

#### **B.1.1. Production des métabolites secondaires**

##### **i. Production de sidérophores**

La détection des sidérophores a été réalisée dans le milieu CAS (Chrome Azurol S) (Annexe 03) en boîte de Pétrie selon les techniques de **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**).

##### **ii. Synthèse de l'acide indole acétique (AIA)**

###### **a. Estimation qualitative de la production d'AIA**

La production d'AIA est déterminée selon la méthode standard de **Bric et al., (1991)**. Une culture bactérienne jeune de 24h de chaque souche a été étalée sur un disque de papier Wattman stérile préalablement déposé sur des boîtes de pétri contenant le milieu LB (Luria-Bertani) (Annexe 03). Après incubation à 28°C pendant 48h, le papier est récupéré, et traité avec le réactif de Salkowski. Après 10 à 30 min, la production d'IAA et/ou de ses analogues se manifeste par la formation d'un halo rose rouge autour des colonies. Pour les souches productrices d'autres types d'indoles la coloration est jaune à jaune brune.

## b. Quantification de l'AIA

La quantification d'AIA et ses dérivés a été évaluée par une méthode chlorométrique (**Glickmann et Desseaux, 1995**). Des flacons contenant 100 ml de milieu TSB (Annexe 03) sont inoculés par un volume de 100µl de chacune des cultures fraîches de *Pseudomonas* spp. fluorescents puis misent à l'incubation à 28°C pendant 72h sous agitation permanente (150 rpm). Après centrifugation à (4000g / 10min), 1ml de surnageant est récupéré et additionné de 2ml du réactif de Salkowski. La suspension est agitée au vortex puis incubée à l'obscurité pendant 20min. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 535 nm. Le développement d'une coloration rose est l'indicateur de la production d'AIA. La concentration d'AIA et de ses dérivés, est obtenue par extrapolation des valeurs des souches productrices par rapport à une courbe standard, établie à partir d'une série de dilutions d'AIA (Sigma-Aldrich) à 50µg/ml dans du TSB (**Gravel et al., 2007**) (Annexe 06).

## iii. Synthèse des antibiotiques

### a. Production de cyanide d'hydrogène

La production d'HCN a été recherchée par la technique de **Bakker et Schippers (1987)** sur le milieu TSA (Tryptone Soya Agar) (Annexe 03) supplémenté avec 4,4 g/l de glycine. Une culture bactérienne jeune de 24h de *Pseudomonas* spp. fluorescents a été ensemencé sur la gélose en boîtes de Pétrie. Un disque du papier Whatman N°1 de 8 cm de diamètre a été imbibé dans une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium) et déposé au fond du couvercle de la boîte. La boîte est fermée avec du parafilm et incubée à 28°C pendant 96 h. Le résultat positif se traduit par le virage du papier Whatman du jaune vers une couleur orange à marron indiquant la production de HCN.

### b. Production de phénazines

La production de phénazine a été recherchée selon la méthode de **Thomashow et Weller (1988)**. La méthode consiste à ensemencer le milieu NBY (Nutrient Broth Yeast extract) (Annexe 03) additionné de glucose (2%) avec une culture de *Pseudomonas* spp. fluorescent de 24h puis incubé pendant 48h à 28°C. L'examen des cultures sous UV (356 nm) montre le développement de colonies pigmentées avec des halos sombres noirâtres, révélateur d'une activité phénazinique.

## iv. Production des enzymes

### a. Phosphatases

La solubilisation des phosphates a été évaluée qualitativement sur milieu de Pikovskaya (Annexe 03). Des cultures fraîches sont déposées sur gélose de Pikovskaya selon deux méthodes: spots (disques) ou par ensemencement par stries serrés puis ont été incubés pendant 96h à 28°C. Les bactéries à activité phosphatasique montrent un halo transparent autour de leurs colonies (**Peix et al., 2001**).Après incubation, le diamètre de la colonie et de l'halo qui l'entoure ont été mesurés (Tableau 03 et 04, Annexe 04). L'indice de solubilisation a été calculé par la formule suivante: (**Paul et Narayan Sinha, 2016**)

$$IS\% = \frac{\text{Diamètre del'halo (mm)} - \text{Diamètre delacolonie (mm)}}{\text{Diamètre delacolonie (mm)}} \times 100$$

#### b. Les enzymes dégradant les parois cellulaires (CWDE)

- **Enzymes protéolytiques**

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 par la méthode des spots. Le développement d'un halo autour des colonies indique une réaction positive. Le diamètre de la colonie et de l'halo qui l'entoure ont été mesurés (Tableau 05 et 06, Annexe 04). L'indice de solubilisation a été calculé par la formule précédente.

- **Chitinases**

L'activité chitinolytique est estimée selon la méthode décrite par **Renwick et al., (1991)** sur gélose à la chitine (Annexe 03) additionnée ou non de glucose. La formation d'halos clairs autour des colonies après 5 jours d'incubation à 30°C indique une chitinase positive (**Naik et Sakthivel, 2006**).

- **Activité amylolytique**

Des cultures fraîches sont déposées sur gélose nutritive additionnée d'amidon (Annexe 03) par ensemencement par trait au centre de la boîte de Pétrie. 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. Ceci implique une absence d'activité amylasique. En revanche, si l'amidon est hydrolysé, une zone claire (un halo) apparaîtrait autour de la crème bactérienne. Ce qui traduit une présence d'activité amylolytique chez les isolats (**Vinoth Raj et al., 2009**).

**v. Production d'ammoniac (NH<sub>3</sub>)**

Ce test est réalisé selon la méthode de **Capuccino et Sherman (1992)**. Le protocole consiste à ajouter 100µl de culture bactérienne jeune dans 10ml d'eau peptonée. Après incubation à 30°C pendant 96 h, 500µl du réactif de Nessler sont ajoutés dans chaque tube d'eau peptonée. L'apparition d'une couleur jaune ou orange indique la production de NH<sub>3</sub>.

**B.2. Test d'activité antagoniste *in vitro* des quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.**

Le test d'activité antagoniste *in vitro* des quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisées vis-à-vis trois souches fongiques de *Fusarium oxysporum* (G1, G2, F2) en comparaison avec les mêmes souches non lyophilisées a été réalisé sur trois milieux différents (PDA, King B, Mixte) par la méthode de confrontation directe.

**a. Purification des souches fongiques**

La pureté des souches fongiques a été réalisée par transplantation successive des disques de champignon de 7 jours dans des boîtes de Pétrie contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (**Johnston et Booth, 1983**) (Annexe 03) (fig 13). Ces derniers ont été incubés à 30°C pendant 7 jours. Les souches purifiées ont été conservées à 4°C.



**Figure 13 :** Vérification des souches de *Fusarium oxysporum*.

**b. Potentialités Antagonistes *in vitro* des lyophilisats :**

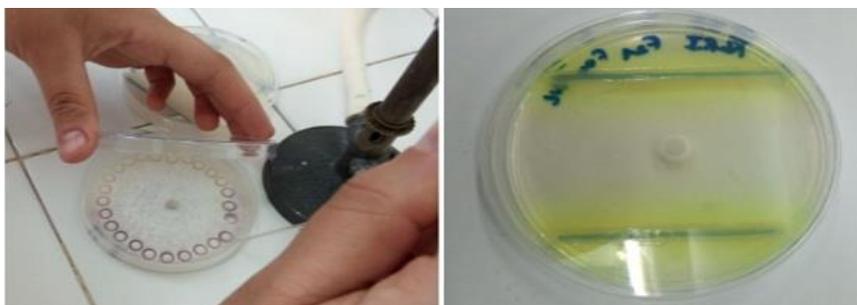
Le test d'antagonisme *in vitro* a été effectué avec quatre souches bactériennes de *Pseudomonas*.spp fluorescents lyophilisées avec protecteurs et les mêmes souches non lyophilisées vis-à-vis trois souches fongique phytopatogène de *Fusarium oxysporum* (*Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*, *Fusarium* f sp *lini* et *Fusarium* f sp *albedenis*) agents de la fusariose vasculaire par la méthode de la confrontation directe en boîte de Pétrie.

Le pouvoir antagoniste de nos souches bactériennes sur l'inhibition de la croissance mycélienne des trois formats spéciales de *Fusarium oxysporum* 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.

La méthode utilisée est celle décrite par **Vincent *et al.*, (1991)**. Les souches de *Pseudomonas.spp* fluorescents sont étalées sous forme d'une ligne sur une distance de 1,5 cm à partir des deux bords d'une boîte de pétrie contenant du milieu gélosé (fig 14). Après 24 h d'incubation, un disque fongique de 6 mm venant d'une culture de 7 jours est déposé au centre de la boîte (fig 15). L'ensemble est incubé à une température de 28°C pendant sept jours. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque interaction.



**Figure 14 :** Ensemencement des souches de *Pseudomonas.spp* fluorescents sous forme de deux stries parallèles.



**Figure 15:** Transplantation d'un disque fongique au centre de boîte de pétrie contenant la souche de *Pseudomonas.spp* fluorescents.

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**) :

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

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

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

## I. Détermination la viabilité des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents après lyophilisation et conservation à 4°C pendant 5 ans avec et sans protection.

### I.1. Dénombrement direct sur boîte de Pétrie

Les résultats de la viabilité des quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisée avec et sans protecteur ont été déterminée avant et après la conservation. Ils sont illustrés dans le tableau(04) et la figure (16).Et l'aspect des colonies développée après 24h d'incubation (fig 17).

**Tableau 04 :** Le taux de viabilité des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent avant et après la conservation.

Souches	Avant stockage (cfu/g)		Après 3 ans de stockage à 4°C (cfu/g)		Après 5 ans de stockage à 4°C (cfu/g)	
	AP	SP	AP	SP	AP	SP
<b>BB<sub>9</sub></b>	4,00.10 <sup>9</sup> (±2,00.10 <sup>9</sup> ) <sup>a</sup>	1,43.10 <sup>10</sup> (±1,97.10 <sup>10</sup> ) <sup>a</sup>	9,00.10 <sup>8</sup> (±2,00.10 <sup>8</sup> ) <sup>a</sup> (22.50) <sup>b</sup>	7,37.10 <sup>8</sup> (±4,73.10 <sup>7</sup> ) <sup>a</sup> (05.15) <sup>b</sup>	8.2. 10 <sup>8</sup> (±1.24.10 <sup>8</sup> ) <sup>a</sup> (20.5) <sup>b</sup>	6.4.10 <sup>8</sup> (±1.16.10 <sup>8</sup> ) <sup>a</sup> (4.47) <sup>b</sup>
<b>BB<sub>10</sub></b>	3,80.10 <sup>10</sup> (±8,54.10 <sup>9</sup> ) <sup>a</sup>	6,40.10 <sup>9</sup> (±7,94.10 <sup>8</sup> ) <sup>a</sup>	9,30.10 <sup>9</sup> (±5,29.10 <sup>8</sup> ) <sup>a</sup> (24.47) <sup>b</sup>	8,50.10 <sup>8</sup> (±1,22.10 <sup>9</sup> ) <sup>a</sup> (13.28) <sup>b</sup>	1,08.10 <sup>9</sup> (±2,57.10 <sup>8</sup> ) <sup>a</sup> (2.84) <sup>b</sup>	7.9.10 <sup>8</sup> (±1.16.10 <sup>8</sup> ) <sup>a</sup> (12.3) <sup>b</sup>
<b>F<sub>21</sub></b>	6,33.10 <sup>9</sup> (±2,52.10 <sup>9</sup> ) <sup>a</sup>	3,53.10 <sup>9</sup> (±7,57.10 <sup>8</sup> ) <sup>a</sup>	7,77.10 <sup>8</sup> (±2,08.10 <sup>8</sup> ) <sup>a</sup> (12.27) <sup>b</sup>	8,90.10 <sup>8</sup> (±1,00.10 <sup>7</sup> ) <sup>a</sup> (25.21) <sup>b</sup>	7,66.10 <sup>8</sup> (±2,73.10 <sup>8</sup> ) <sup>a</sup> (12) <sup>b</sup>	7.8.10 <sup>8</sup> (±1.75.10 <sup>8</sup> ) <sup>a</sup> (22.09) <sup>b</sup>
<b>PI<sub>9</sub></b>	2,2. 10 <sup>11</sup>	/	7,1.10 <sup>10</sup> (4,2.10 <sup>10</sup> ) <sup>a</sup> (32.27) <sup>b</sup>	/	2,18.10 <sup>10</sup> (±2,10.10 <sup>9</sup> ) <sup>a</sup> (30.7) <sup>b</sup>	/

**a :** écart type issu de trois répétitions.

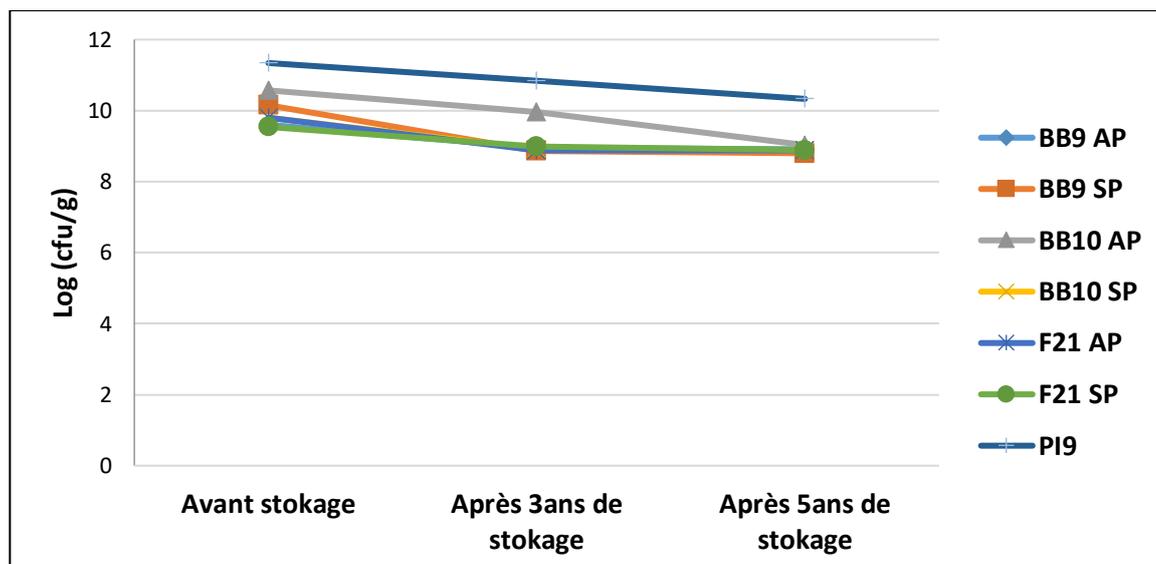
**b :** Viabilité(%) des cellules lyophilisées et stockées à 4°C. **AP :** avec protecteur ; **SP :** sans protecteur.

Comme présenté dans le tableau (04), la viabilité des souches de *Pseudomonas* spp. évaluée par dénombrement sur gélose KB a été diminué après 5ans de stockage en comparaison avec les résultats avant stockage et après 3 ans de stockage. Le taux de survie varie entre 2.84% à 32.27% enregistrés respectivement par les souches BB10 et PI9 lyophilisées avec protecteur et entre 4.27% à 25.21% enregistrés respectivement avec les souches BB9 et F21 lyophilisées sans protecteur.

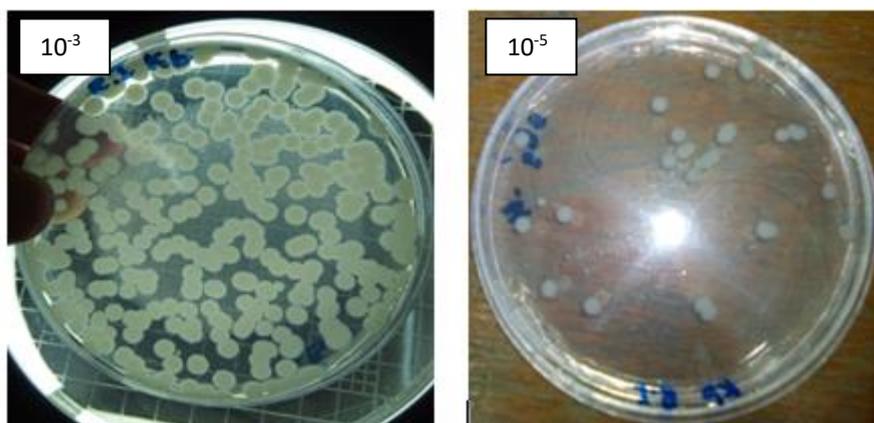
L'utilisation des composés protecteurs avant la lyophilisation ont permis de maintenir une viabilité remarquable à la fin de la lyophilisation et au cours du stockage de *Pseudomonas* spp. fluorescent en comparaison avec les même souches lyophilisées sans agents protecteurs.

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

viabilité élevée des bactéries pendant la lyophilisation et au cours du stockage (Lievens *et al.*, 1993 ; Leslie *et al.*, 1995 ; Kawahara, 2008).



**Figure 16 :** Evolution des concentrations des quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent avant, t et après 3 ans et après 5 ans de la conservation à 4°C.



**Figure 17 :** Aspect des colonies de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

### Etude d'efficacité des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent lyophilisées

#### A. Production de quelques métabolites secondaires par les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisées et non lyophilisées.

Les résultats de la recherche de la production de métabolites secondaires testés sur quatre isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisée et quatre isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents non lyophilisée sont illustrés dans le tableau(05).

**Tableau 05** :Principaux métabolites secondaires produits par *Pseudomonas* spp. Fluorescents lyophilisée et non lyophilisées.

	Métabolites secondaires.	Sid	AIA	HCN	Phénazine	Phosphatase	Protéase	Amylase	Ammoniac	Chitinase
Souches lyophilisées	Nombre de Souches	4	4	0	3	4	4	1	4	0
	%*	100	100	0	75	100	100	25	100	0
Souches non lyophilisées	Nombre de Souches	4	4	4	3	4	4	1	4	4
	%*	100	100	100	75	100	100	25	100	100

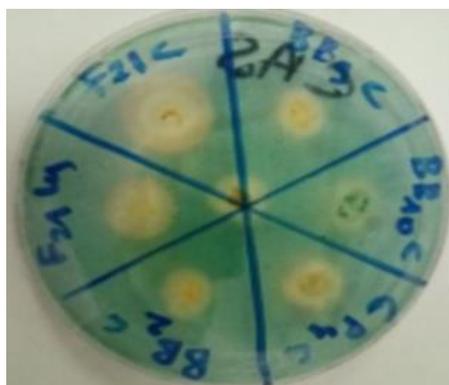
**AIA** : Acide-indole-acétique, **HCN** : Cyanide d'hydrogène, **Sid** : Sidérophores, %\* : le pourcentage par rapport de quatre souches testées.

Selon le tableau (05), 100% des souches non lyophilisées ont le pouvoir de produire les sidérophores, l'AIA, HCN, phosphatase, protéase, chitinase et l'ammoniac, 75% produisent le phénazine, 25% produisent l'amylase

Chez *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisée, 100% des lyophilisats ont le pouvoir de produire les sidérophores, l'AIA, phosphatase, protéase et l'ammoniac, 75% produisent les phénazine, 25% produisent l'amylase. Par contre on a marqué une absence totale de production d'HCN et de chitinase.

#### i. Production des sidérophores

Toutes les souches bactériennes lyophilisées et non lyophilisées ont montré une capacité de production des sidérophores. Le résultat positif a traduit par la décoloration du réactif CAS du bleu vers un halo orangeâtes sur le fond bleuté du ce milieu (fig18).



**Figure 18** : Production des sidérophores par les *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents synthétisent de nombreux sidérophores chélateurs du fer ionique, qui exhibent des effets fongistatique et bactériostatique, tels que les pyoverdines (Benchabane *et al.*, 2012). La production de sidérophores par *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été confirmés par le test Universel CAS (Bholay *et al.*, 2012). La formation d'halo orangé autour des colonies indique la chélation du  $Fe^{3+}$  par les sidérophores (Guan *et al.*, 2001; Sreedevi, 2014).

Plusieurs auteurs confirment la production des sidérophores sur milieu chromo-azurool S (CAS) par différentes souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (Sayed *et al.*, 2004 ; Aditi, 2010 et Bholay *et al.*, 2012).

## ii. Production de l'acide –indole –acétique (AIA)

La production de l'acide – indole –acétique a été déterminée qualitativement et quantitativement, les résultats sont illustrés dans le tableau (06).

**Tableau 06:** Production qualitative et quantitative d'Acide Indole Acétique (AIA) chez les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisées et non lyophilisées.

Souches	Les souches non lyophilisées		Les souches lyophilisées	
	Production qualitative	Production quantitative en $\mu\text{g/ml}$	Production qualitative	Production quantitative en $\mu\text{g/ml}$
F21	+	1.8	+	1.6
BB9	(+)*	Nd	(+)*	Nd
BB10	+++	5.9	++	4
PI9	(+)*	Nd	(+)*	Nd

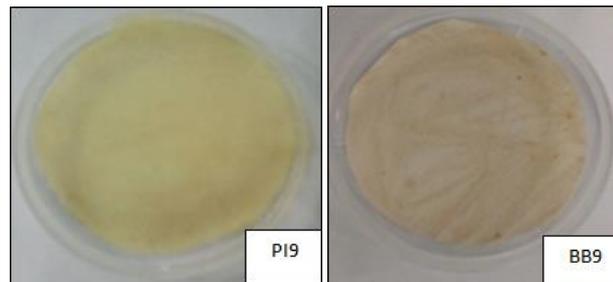
(+) : légèrement rose, (++) : rose, (+++) : rose virant vers le rouge, **Nd** : non détectable, (+)\* : Analogue d'AIA.

### a. Estimation qualitative de la production d'AIA

La production qualitative de l'acide indole acétique et/ou ses analogues a été observé chez les souches lyophilisées et non lyophilisées. BB10 et F21 ont développé une coloration rose à rouge après 10 à 30 min d'addition du réactif révélateur (réactif de Salkowski) indique la production d'AIA (fig19). Pour les souches productrices d'autres types d'indoles (PI9, BB9), la coloration est jaune à jaune brune dont l'intensité varie d'un isolat à un autre (fig20).



**Figure 19** : Production de l'acide-indole-acétique par la souche BB10 de *Pseudomonas* spp. fluorescents. **T** :Témoin. **L** :lyophilisés. **NL** : non lyophilisées.



**Figure 20**: Production d'autres types d'AIA par quelques souches *Pseudomonas* spp. fluorescent.

### b. Production quantitative de l'AIA

L'apparition d'une couleur rose indique la présence de l'AIA (fig 21). La quantité de ce dernier est déterminée, d'après la courbe d'étalonnage (Annexe 06), par lecture de l'absorbance à 535 nm en comparant avec un témoin (1 ml de milieu non-inoculé + 2 ml de réactif de Salkowski). La concentration varie d'un isolat à un autre (Tableau06).



**Figure 21** : Production de de l'acide-indole-acétique par *Pseudomonas* spp. fluorescents sur milieu liquide.

Environ 80% des bactéries rhizosphériques sont capables de produire de l'acide-indole-acétique (AIA) (Dastager *et al.*, 2010). La synthèse d'AIA est largement réponde chez les

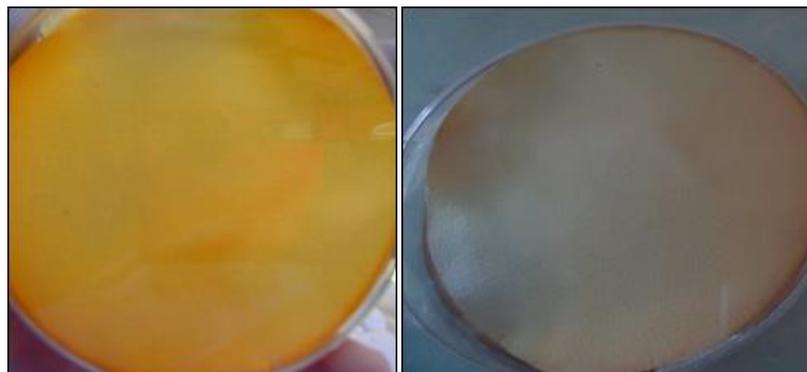
*Pseudomonas* spp. fluorescents (**Oberhansli et al., 1991 ; Forlani et al., 1995 et Persello-Cartieaux et al., 2003**). La production de cette hormone par *Pseudomonas* est bénéfique pour la croissance et le développement végétal. Elle joue un rôle très important dans la division cellulaire, l'élongation des racines, la prolifération des poils absorbants et dans le mécanisme de tolérance de la plante (**Sandhya et al., 2010**). Les rhizobactéries synthétisent d'une manière prédominante l'AIA à partir du tryptophane par la voie de l'acide indole-3-pyruvique. Le L-tryptophane est considéré comme le précurseur parce que son adjonction est nécessaire à la production. Les exsudats racinaires sont une source naturelle de L-tryptophane pour la microflore de la rhizosphère (**Dastager et al., 2010**). La production de ce composé est variable entre les souches de différentes espèces. Cette variation est aussi influencée par les conditions de culture, la phase de croissance et la disponibilité du substrat (**Miraza et al., 2001**).

Plusieurs auteurs confirment la production d'AIA par L-tryptophane par différentes souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (**Oberhansli et al., 1991 ; Munees et Mulugeta, 2013 et Karnwal, 2014**).

### iii. Synthèse des antibiotiques

#### a. Production de cyanide d'hydrogène

Une réaction négative pour l'ensemble des lyophilisats testés est marquée lors de la mise en évidence de la production d'HCN dans le milieu TSA additionnée de 4.4 g/l de glycine après 96h d'incubation à 28°C (fig 22). Par contre une réaction positive pour l'ensemble des souches non lyophilisées indique une production important d'HCN (fig 23).



**Figure 22:** Production d'HCN par les souches non lyophilisés.



**Figure 23:** Absence de production d'HCN par les souches lyophilisées.

La production du métabolite secondaire cyanure d'hydrogène (HCN) est bien documenté chez les procaryotes en particulier dans le phylum Proteobacteria, où il a été observé dans plusieurs espèces de *Pseudomonas* fluorescentes comme *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas protegens*. Le cyanure d'hydrogène (HCN) est un métabolite secondaire produit par de nombreuses espèces de *Pseudomonas* (**Frydenlund Michelsen et Stougaard, 2012**). La cyanogénèse possède un rôle écologique. C'est le cas de la bactérie bénéfique colonisant les racines *P. fluorescens* CHAO (**Voisard et al., 1989**), qui protège de nombreuses plantes des maladies racinaires fongiques (**Voisard et al., 1994; Schnider et al., 1995**).

Les travaux de plusieurs auteurs (**Fremane et al., 1975; Askeland et Morrison, 1983; Siddiqui et al., 2005; Frydenlund Michelsen et Stougaard, 2012 et Reetha et al., 2014**) ont démontré la capacité des différentes souches de *Pseudomonas* fluorescents à produire de l'HCN.

L'absence de production d'HCN par les *Pseudomonas* spp. fluorescentes lyophilisées est due probablement soit à l'effet de la lyophilisation. D'après les travaux **Mputu et al., (2014)**, La lyophilisation est la méthode de séchage la plus utilisée pour les *Pseudomonas*. Mais les changements de température induit par le séchage ne sont pas sans conséquence pour les cellules. Ils sont responsables des altérations cellulaires (peroxydation des acides gras) de l'oxydation des protéines et de l'ADN. Ou bien à l'effet d'une mutation, d'après les auteurs (**koskiniemi, 2010 ; Najafi et Pezeshki, 2013 et Watford et Warrington, 2017**), une mutation est un changement dans la séquence nucléotidique qui peut créer de nouvelles fonctionnalités cellulaires ou conduire au dysfonctionnement des autres (**Watford et Warrington, 2017**). Elle peut être bénéfique ou préjudiciable, spontanées en raison de processus cellulaires, ou induites par un mutagène dans l'environnement (**Najafi et Pezeshki, 2013**). La mutation joue un rôle fondamental dans l'évolution, mais elle constitue également une menace potentielle pour la

viabilité et la survie des cellules. Une mutation inactivant dans un gène essentiel entraîne la mort cellulaire, et pour les organismes unicellulaires tels que les bactéries, la perte de cet individu de la population (**koskiniemi, 2010**). Ce qui confirme l'absence de production d'HCN avec les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisés.

#### **b. Production de phénazines**

La production de phénazine est testée sur le milieu NBY additionné de glucose (2%), trois souches bactériennes lyophilisées et non lyophilisées ont montré une réaction positive (PI9, F21, BB10), L'examen des cultures sous UV (356 nm) montre le développement de colonies pigmentées avec des halos sombres noirâtres, révélateur d'une activité phénazinique.

Beaucoup de *Pseudomonas* spp. fluorescents sont capables de protéger les plantes d'une grande variété de pathogènes bactériens, fongiques et oomycètes. Cette protection jusqu'à présent, a été principalement attribuée à la production d'antibiotiques. Un excellent exemple de ceci est la production de l'acide phénazine-1-carboxylique antibiotique (**Thomashow et Weller, 1988 et Morrison et al., 2017**).

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

Les résultats obtenus au cours de cette expérimentation concordent avec plusieurs travaux précédents qui ont démontré la production de phénazines par les *Pseudomonas* (**Thomashow et Weller, 1988 ; Thomas et al., 2002 ; Zhengyu Huang et al., 2004 ; Perneel et al., 2006 ; Park et al., 2010 ; Beneduzi et al., 2012 ; Parejkoet al., 2013 et Morrison et al., 2017**).

#### **iv. Production d'enzymes**

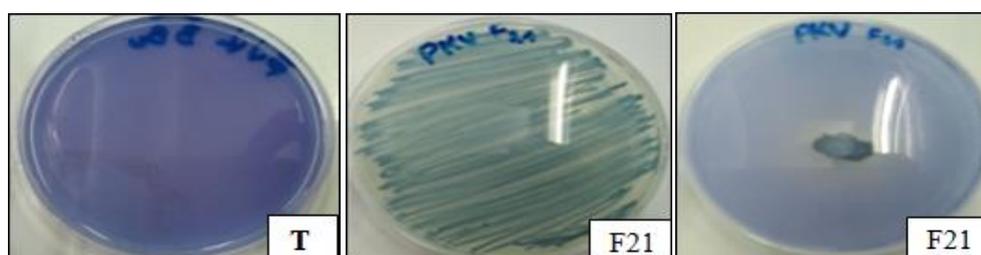
Les tests qualitatifs permettent de démontrer la production ou non d'enzymes extracellulaire (la phosphatase), enzymes protéolytique, enzymes dégradants les parois cellulaires.

##### **a. Phosphatases :**

Le test de solubilisation du phosphate indique que 100% des souches lyophilisées et non lyophilisées testées synthétisent la phosphatase pour solubiliser le phosphore inorganique sous forme bicalcique.

La décoloration du milieu de culture et/ou le développement d'un halo clair autour les spots (fig 24,25 et 26) indique une réaction d'une phosphatase positive. L'intensité de la couleur du milieu de culture et le diamètre des halos sont variable selon les souches (fig 24 et 25), ce qui montre une variabilité dans le pouvoir de solubilisation du phosphore entre les isolats testés.

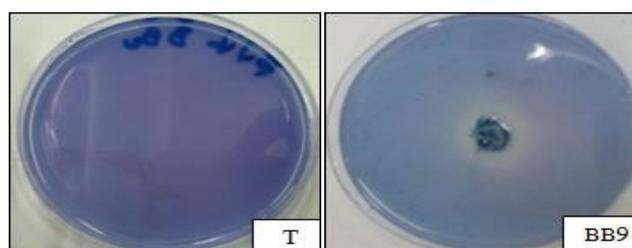
Le meilleur résultat chez les souches lyophilisées est observé chez la lyophilisat F21 d'indice de 52,94% tandis que la lyophilisat BB9 a marqué un faible résultat de l'indice de 16,66% (tableau 04, annexe 04). Chez les souches non lyophilisées, le meilleur résultat est observé chez la souche F21 d'indice de 63,1%, tandis que la souche BB9 a marqué un faible résultat d'indice de 19,04% (tableau 03, annexe 04).



**Figure 24:** Forte production de phosphatase par *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisés.  
(T) : Témoin.



**Figure25:** Faible production de phosphatase par *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisés.



**Figure 26:** Production de phosphatase par *Pseudomonas* spp. fluorescents non lyophilisés.

(T) : Témoin.

Nos résultats concordent avec les résultats obtenus par différents auteurs (**Park et al., 2009; Paul et Narayan Sinha, 2016 et Alemu,2013**).L'amélioration de l'alimentation minérale de la plante en phosphore a été la première hypothèse proposée pour expliquer l'effet bénéfique enregistré à la suite de la bactérisation des plantes. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents,

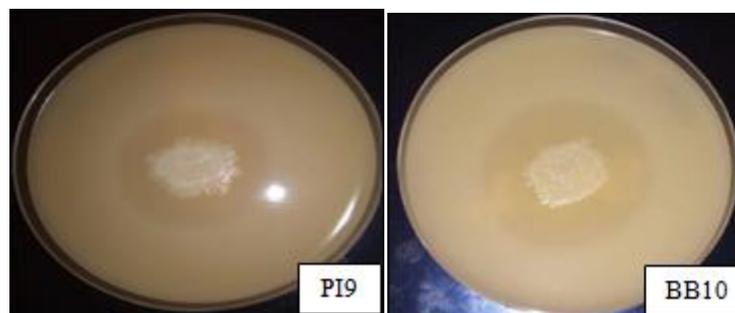
augmentent la concentration en phosphore soluble soit par minéralisation des phosphates organiques, grâce à des phosphatases, soit par solubilisation des phosphates inorganiques, sous l'effet d'acides (**Lemanceau, 1992**). Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués, le principal étant la production d'acides organiques. Les acides organiques sont signalés pour solubiliser P insoluble en diminuant le pH ou en complexant le cation qui est lié au P (**Park et al., 2009**).

#### b. Les enzymes dégradant les parois cellulaires (CWDE)

- **Enzymes protéolytiques :**

L'activité protéolytique est testée sur un milieu au lait écrémé. Toutes les souches bactériennes lyophilisées et non lyophilisées ont montré une réaction positive dans la dégradation des protéines par production de protéases. Le développement d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive (fig 27). La variation dans les diamètres des halos dépend des souches testées.

Le meilleur résultat chez les souches lyophilisées est observé chez la lyophilisat BB10 d'indice de 46,66% tandis que la lyophilisat F21 a marqué un faible résultat de l'indice de 10,71%(tableau 06, annexe 04). Chez les souches non lyophilisées, le meilleur résultat est observé chez la souche BB10 d'indice de 84,21%, tandis que la souche F21 a marqué un faible résultat d'indice de 21,21% (tableau 05, annexe 04).



**Figure 27 :** Production des enzymes protéolytiques par *Pseudomonas* spp. fluorescents.

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

Les protéases sont les enzymes industrielles les plus importantes exécuter une grande variété de fonctions et avoir diverses applications biotechnologiques importantes (**Kalaiarasi et Sunitha, 2009**). Ils sont des enzymes extracellulaires sécrétées par les bactéries, principalement des espèces de *Pseudomonas* (**Rajmohan et al., 2002**). Ils jouent un rôle dans la dégradation des parois cellulaires fongiques (**Stanier et al., 1966**).

- **Chitinase :**

L'activité chitinolytique des souches bactériennes est testée sur un milieu gélose nutritif sans glucose additionné de 2 g de chitine. La chitinase est produite par la totalité des souches non lyophilisées étudiées (100%). Par contre une réaction négative pour l'ensemble des lyophilisats est marquée lors de la mise en évidence de la production de chitinase.

Le parasitisme et/ou la lyse des champignons par les bactéries de la rhizosphère est facilitée par la production d'enzymes hydrolytiques, qui dégradent les parois des cellules fongiques (CWDE : cell wall degrading enzymes). Les chitinases, sont des enzymes hydrolytiques d'importance majeure, puisque la chitine est le constituant majeure de la majorité des parois cellulaires des champignons phytopathogènes (**Kishore et al., 2005**). L'activité chitinolytique des souches de *Pseudomonas* spp (**Verma et al., 2007**) a été rapportée comme activité antifongique.

Plusieurs auteurs confirment la capacité des souches de *Pseudomonas* fluorescents de produire ce enzyme (**Folders et al., 2001 ; Ramyasmruthi et al., 2012 et Suganthi et al., 2015**).

L'absence de production de chitinase chez les souches lyophilisées peut être dû au dommage subit par la membrane cytoplasmique après la déshydratation, ce qui entraîne comme conséquence le relargage en solution des composants intracellulaires (cations, nucléotides, enzymes, protéines) des cellules lyophilisées au cours de leur réhydratation (**Mputu et al., 2014**). Ou peut être dû au dommage subit par des mutations qui peuvent conduire à des changements dans la structure d'une protéine codée ou à une diminution ou une perte complète de son expression. Parce qu'une modification de la séquence d'ADN affecte toutes les copies de la protéine codée, les mutations peuvent être particulièrement dommageables pour une cellule ou un organisme (**Lodish et al., 2000**).

**Production d'amylase :**

L'activité amylolytique des souches bactériennes est testée sur un milieu gélose nutritif additionné de 1 g de l'amidon, La lecture s'est effectuée par lugol, L'activité amylolytique est positive que chez la souche (PI9) lyophilisées et non lyophilisées (fig 28).



**Figure 28:** Production d'amylase par la lyophilisat PI9.

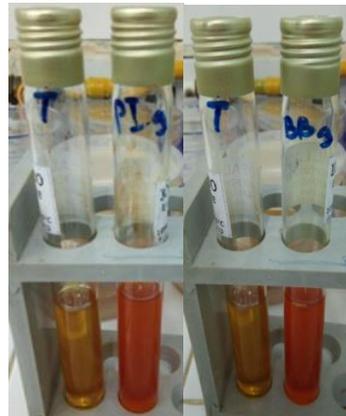
T : Témoin ; NL : non lyophilisé ; L : lyophilisé

Le genre bactérien *Pseudomonas* est un producteur prolifique d'un certain nombre d'enzymes extracellulaires, y compris la lipase et l'amylase (**Khannous et al., 2014**). Les amylases sont parmi les plus importantes enzymes dans l'industrie actuelle. Les bactéries dégradant l'amidon sont les plus importantes pour les industries telles que l'alimentation, la fermentation, le textile et le papier (**Sunder Alariya et al., 2013**).

Notre résultat est concordé avec les travaux de ces auteurs (**Sunder Alariya et al., 2013 et Khannous et al., 2014**).

#### v. Production d'ammoniaque :

La production de l'ammoniaque est révélée chez toutes les souches lyophilisées et non lyophilisées par l'addition de réactif de Nessler. Le résultat positif se traduit par le virage la couleur du milieu vers le jaune ou orange (fig 29).



**Figure 29:** Production d' $\text{NH}_3$  par toutes les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

La production d'ammoniac est considérée comme un élément important des rhizobactéries en améliorant indirectement la croissance des plantes (**Joseph et al., 2007**) et en assurant un rôle dans la signalisation lors de l'interaction plante-rhizobactéries (**Becker et al., 2002**). Les espèces de *Pseudomonas* sont connues avoir un rôle important dans la suppression de certaines maladies apparemment via la production d'antifongiques métabolites tels que

l'ammoniac (Hamid *et al.*,2003). Il est bien établi que l'ammoniac libéré par les bactéries accélère l'activité de la glutamine synthétase (Sood *et al.*, 2002).

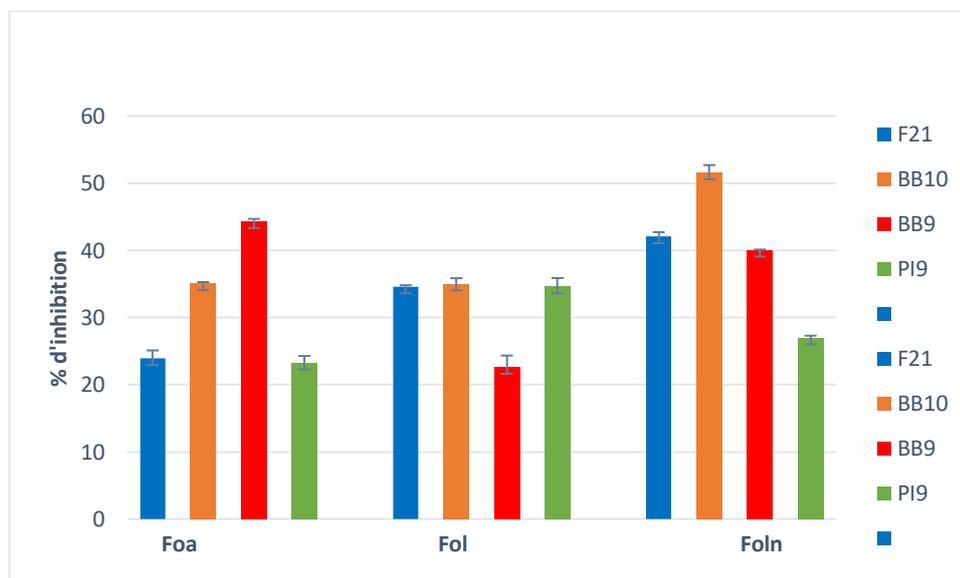
## B.2. Résultats de test d'activité antagoniste *in vitro*

Le test d'antagonisme a été réalisé par les quatre souches de *Pseudomonas*. spp fluorescents lyophilisés en comparaison avec les souches non lyophilisées vis-à-vis trois souches fongiques de *Fusarium oxysporum*.

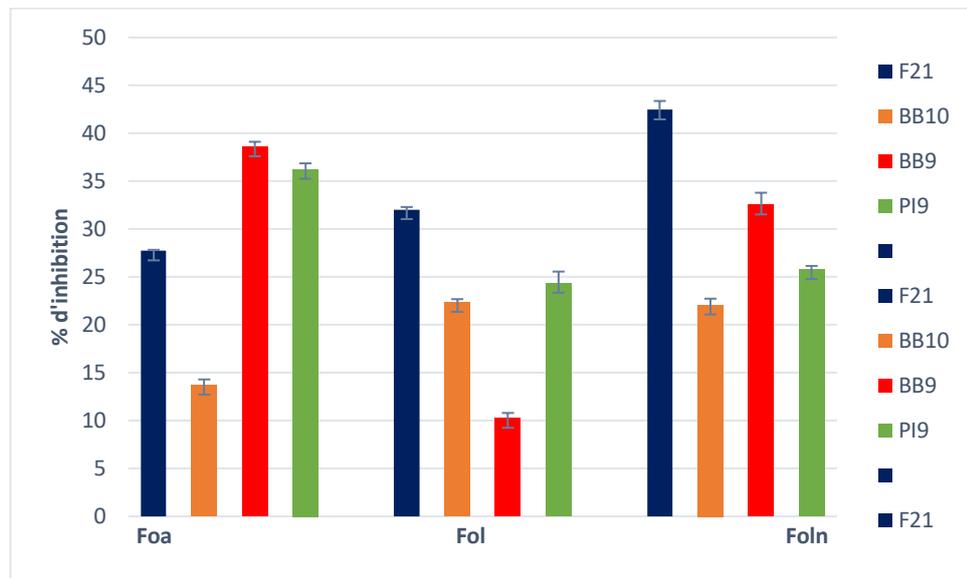
Les tests d'antagonisme *in vitro* montrent que les quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (BB10, BB9, PI9et F21) exercent des effets antagonistes vis-à-vis les trois formes spéciales de *Fusarium oxysporum* (F.o.a, F.o.l et F.o.ln) sur les trois milieux de culture (PDA, KB et le milieu mixte),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

D'après les figures (30 a 44), nous constatons que les souches bactériennes utilisées ont montré des activités antagonistes substantielles, variables sur les trois milieux de culture examinés, causant des zones claires d'inhibition et limitant la croissance des trois forma spéciales de *Fusarium oxysporum*.

### ➤ Sur le milieu PDA

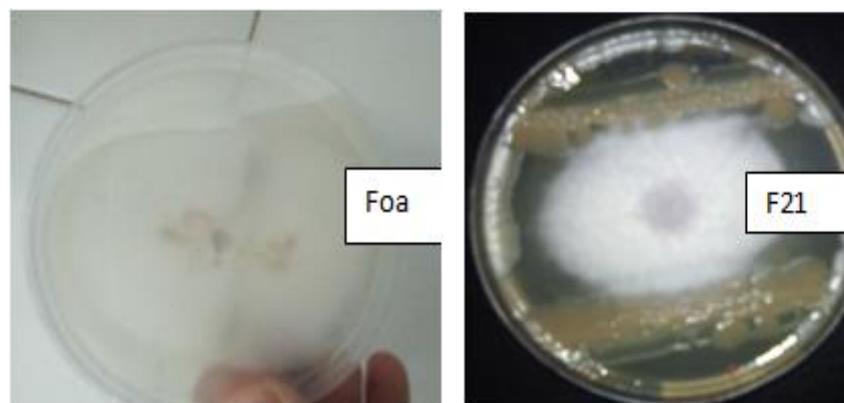


**Figure 30:** Le taux d'activité antagoniste des quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent non lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de *Fusarium* sur milieu PDA.

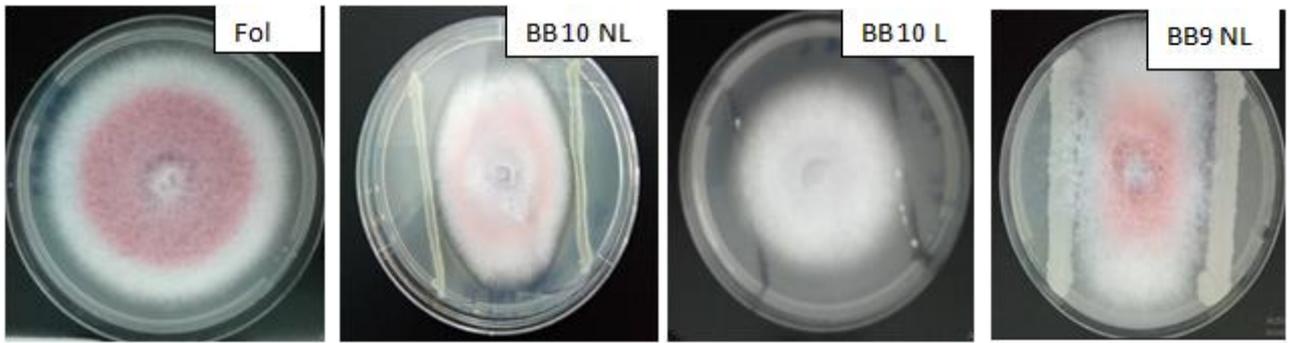


**Figure 31 :** Le taux d'activité antagoniste des quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de *Fusarium* sur milieu PDA.

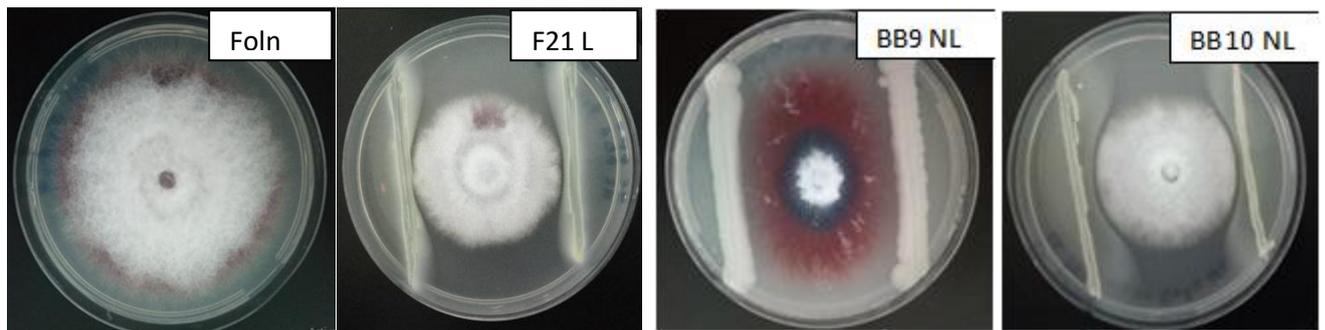
A travers les résultats obtenus en comparaison avec le témoin (absence des antagonistes), pour les lyophilisats, l'effet antagoniste le plus important a été enregistré avec les souches BB10 vis-à-vis F.o.ln avec un taux d'inhibition 49.2% et le taux le plus faible a été signalé avec la souche BB9 vis-à-vis F.o.l avec un taux d'inhibition de 10.13%. Pour les souches non lyophilisées, l'effet antagoniste le plus faible a été signalé par la souche bactérienne PI9 vis-à-vis F.o.ln avec un taux d'inhibition de 26.98%, et le taux le plus élevé a été enregistré par la souche bactérienne BB10 vis-à-vis F.o.ln avec un taux d'inhibition de 51.58%.



**Figure 32:** Activité antagoniste de la souche F21 lyophilisée vis-à-vis F.o.a sur milieu PDA.

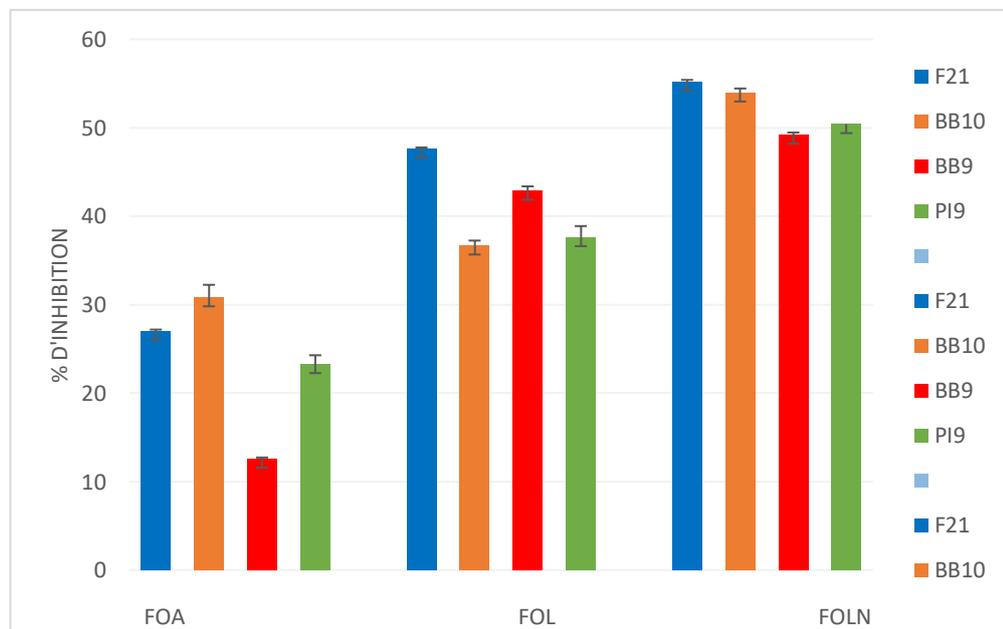


**Figure 33:** Activité antagoniste de BB10 et BB9 vis-à-vis F.o.l sur milieu PDA. L : lyophilisée. NL : non lyophilisée.

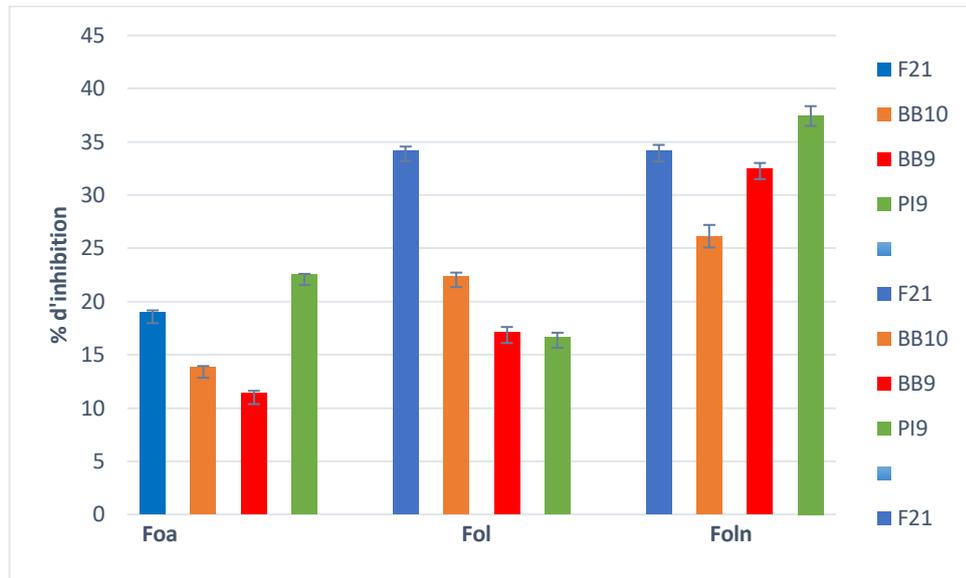


**Figure 34 :** Activité antagoniste de lyophilisat F21, BB9 etBB10 vis-à-vis F.o.ln sur milieu PDA. L : lyophilisée. NL : non lyophilisée.

➤ **Sur le milieu King B**

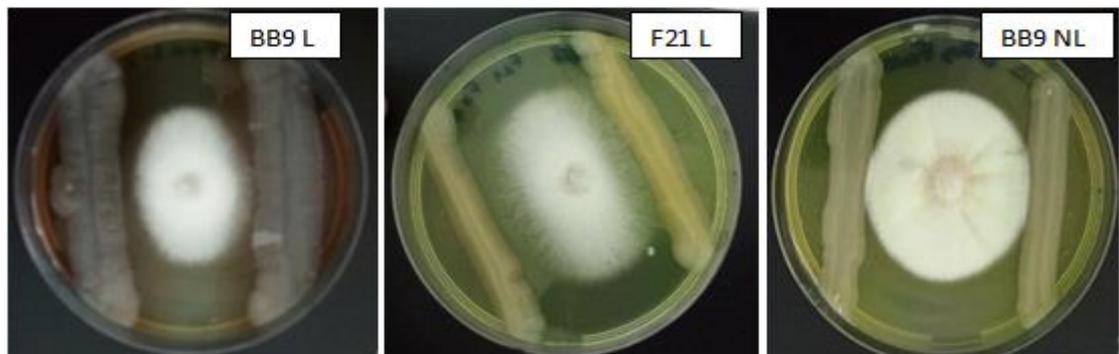


**Figure 35:** Le taux d'activité antagoniste des quatre souches de *Pseudomonas* spp. non lyophilisées fluorescent vis-à-vis les trois formes spéciales de *Fusarium* sur milieu KB.

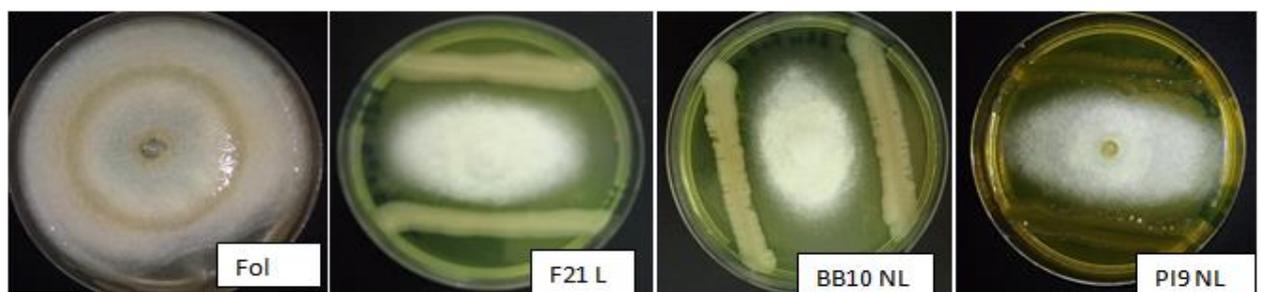


**Figure 36 :** Le taux d'activité antagoniste des quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de *Fusarium* sur milieu KB.

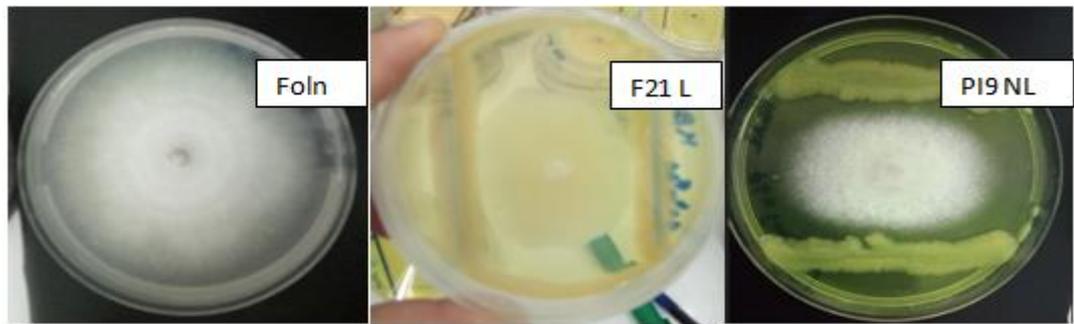
Nous avons noté que le lyophilisat F21 vis-à-vis F.o.In montre un taux d'inhibition le plus élevé sur milieu KB avec un taux d'inhibition 47.21% et le taux d'inhibition le plus faible a été enregistré avec la souche PI9 vis-à-vis F.o.l (9.28%). Pour les souches non lyophilisées, l'effet antagoniste le plus important a été enregistré par la souche F21 vis-à-vis F.o.In avec un taux d'inhibition de 55.15%, alors que le taux le plus faible a été noté par la souche bactérienne BB9 vis-à-vis F.o.a avec un taux d'inhibition de 12.57%.



**Figure 37:** Activité antagoniste de la souche BB9 et F21 vis-à-vis F.o.a sur le milieu KB. L : lyophilisée. NL : non lyophilisée.

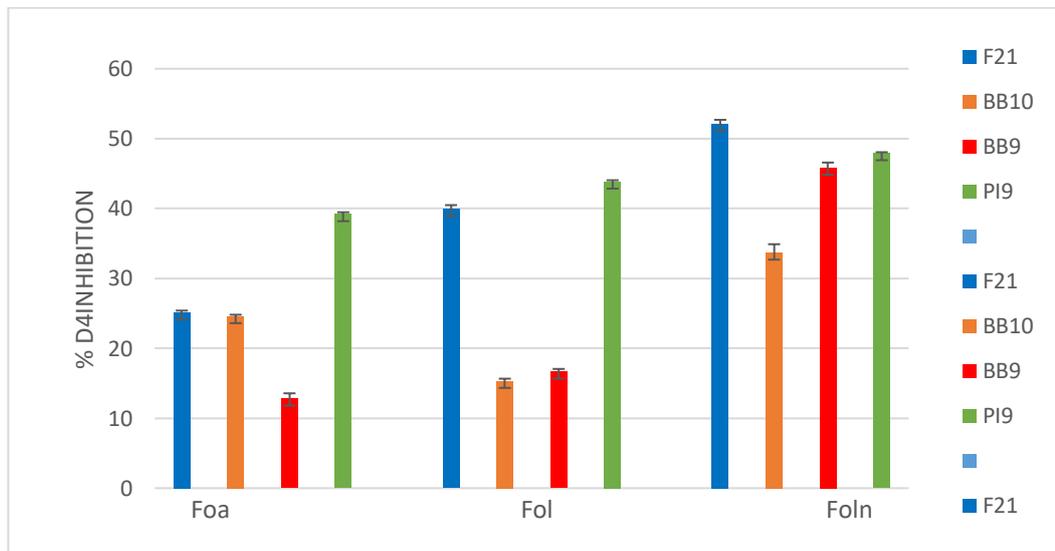


**Figure 38:** Activité antagoniste de la souche F21, BB10 et PI9 vis-à-vis Fol sur milieu KB. L : lyophilisée. NL : non lyophilisée.

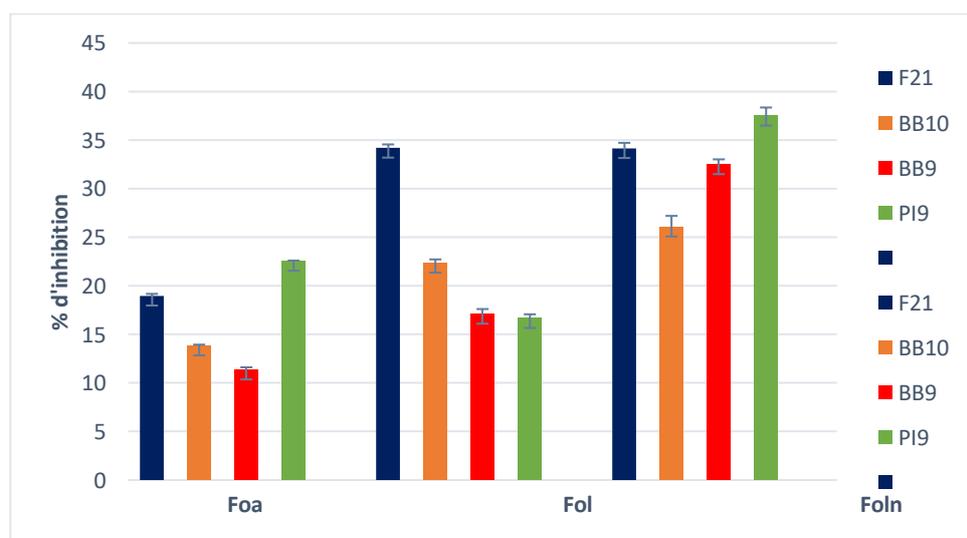


**Figure 39:** Activité antagoniste de la souche F21 et PI9 vis-à-vis F.o.ln sur milieu KB. L : lyophilisée. NL : non lyophilisée.

➤ **Sur le milieu mixte**

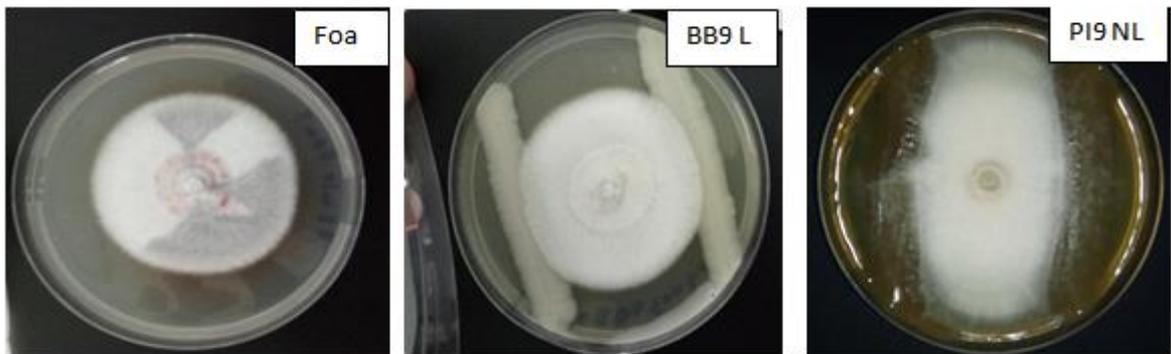


**Figure 40 :** Le taux d'activité antagoniste des quatre souches *Pseudomonas* spp. fluorescent non lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de *Fusarium* sur milieu mixte.

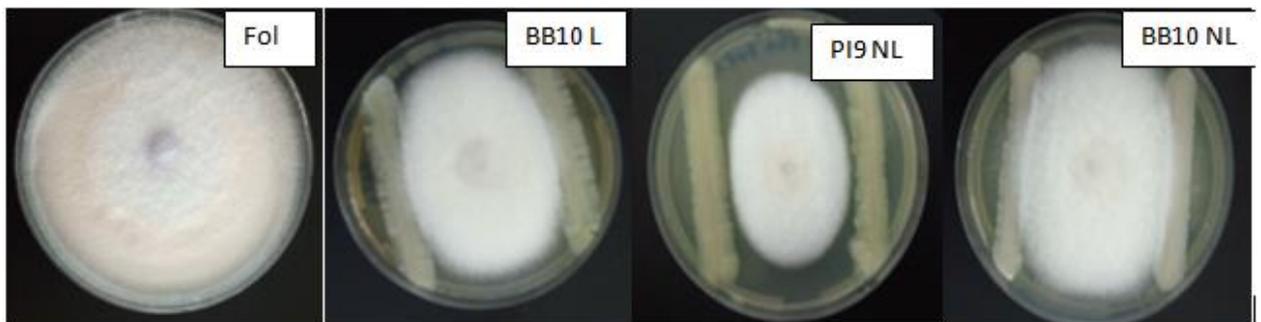


**Figure 41:** Le taux d'activité antagoniste des quatre souches *Pseudomonas* spp. fluorescent lyophilisées vis-à-vis les trois formes spéciales de *Fusarium* sur milieu mixte.

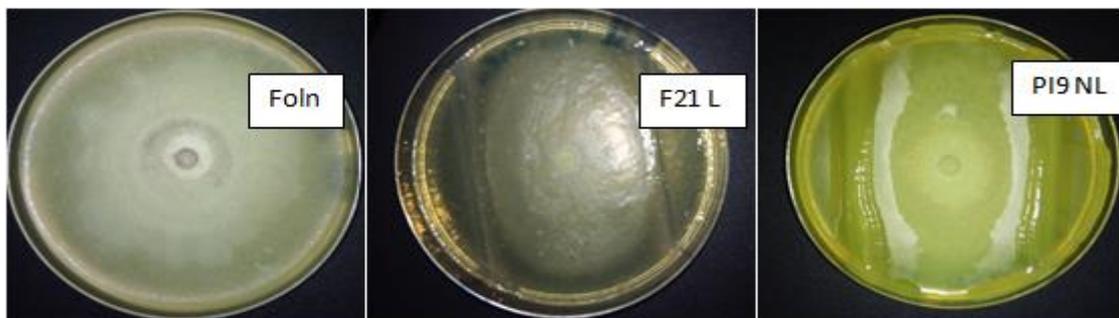
Les résultats de l'inhibition de la croissance des trois formes spéciales de l'agent pathogène *Fusarium* sur milieu mixte illustré par les figures (45 - 46) montrent que le taux d'inhibition maximal a été noté avec lyophilisat PI9 vis-à-vis F.o.ln (37.5%), et le taux le plus faible a été obtenu avec lyophilisat BB9 vis-à-vis F.o.a (11.36%). La croissance mycélienne de l'agent pathogène en confrontation avec les quatre souches bactériennes non lyophilisées correspond à des taux d'inhibition importante. La souche F21 représente l'activité antagoniste la plus élevée vis-à-vis F.o.ln avec un taux de 52.08%. Alors que la souche BB10 vis-à-vis F.o.l montre un taux d'inhibition le plus faible 15.34%.



**Figure 42:** Activité antagoniste de la souche BB9 et PI9 vis-à-vis F.o.a sur le milieu mixte. L : lyophilisée. NL : non lyophilisée.



**Figure 43:** Activité antagoniste de la souche BB10 et PI9 vis-à-vis F.o.l sur milieu mixte. L : lyophilisée. NL : non lyophilisée.



**Figure 44:** Activité antagoniste de la souche F21 vis-à-vis F.o.ln sur milieu mixte. L : lyophilisée. NL : non lyophilisée.

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

Tous les souches ont montré un spectre d'action important vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f sp *lini* et *Fusarium oxysporum* f sp *albedinis*, avec des % d'inhibition variant de 9.28 à 55.15%. Les meilleurs résultats d'activité antagoniste ont été marqué vis-à-vis F.o.ln sur les trois milieux de culture.

Les souches F21, et BB10 présentent les taux d'inhibition les plus importants contre F.o.ln avec des taux d'inhibition dépassant les 50%, le taux d'inhibition le plus faible a été noté par lyophilisat PI9 sur le milieu KB vis-à-vis F.o.a et F.o.l avec un % d'inhibition de 9.4 % et 9.28%.

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

Les bactéries Gram+ résistent mieux à la lyophilisation, comme les bactéries lactiques (Castro *et al.*, 1995 ; Selmer-Olsen *et al.*, 1999 et Nanasombat *et al.*, 2007), tandis que leurs homologues Gram-, *Pseudomonas* et *Escherichia coli*, sont très sensibles à toute forme de séchage (Louis *et al.*, 1994 et Palmfeldt *et al.*, 2003). Pendant la lyophilisation, les cellules sont soumises à des contraintes plus importantes ce qui explique pourquoi elles ci sont moins résistantes (Palmfeldt *et al.*, 2003 et Nanasombat et Sriwong, 2007) .Les parois cellulaires des bactéries Gram négatives, avec une couche mince de peptidoglycane, ont tendance à une grande rupture pendant les processus de dessiccation et de réhydratation. L'absence de l'acide techoïque chez la bactérie Gram négative réduit sa résistance au séchage par rapport à son homologue Gram positive (Pembrey *et al.*, 1999).

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

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

Sur le milieu KB, le principal mécanisme mis en cause dans l'effet antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent pourrait être liée à la synthèse des sidérophores qui chélatent les ions de fer trivalent, suite à la production des pigments fluorescents (**Hass et al., 1991 ; Digat, 1992 et Weller et Thomashow, 1993**). Selon O'sullivan et O'gara (1992). La production de sidérophores par les bactéries rend le fer non disponible pour les champignons pathogènes. Les pigments fluorescents sont synthétisés en grande quantité dans des conditions de cultures carencées en fer (**Meyer, 1977**). Les pyoverdines jouent un rôle de sidérophore puisqu'elles complexent les ions ferriques (**Meyer et Abdallah, 1978**) et facilitent le transport du fer au travers de la membrane bactérienne (**Meyer et al., 1979**).

Les résultats de test de production des métabolites secondaires, confirment la production de sidérophores par les *Pseudomonas* spp. fluorescents.

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

Plusieurs études corroborent nos résultats. **Weller et al., (1988)**, ont confirmé que la compétition pour le fer n'est pas le seul mode d'action des *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes. **Colin et al., (1984)** et **Fravel (1988)**, ont montré qu'il n'y'a pas de corrélation entre l'activité antagoniste des *Pseudomonas* spp. fluorescents et la concentration en pigment fluorescent, même si ces bactéries sont plus aptes à mobiliser le fer que les *Fusarium*. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents possèdent d'autres mécanismes inhibiteurs, qui peuvent être attribués à la synthèse d'antibiotiques et d'autres types de métabolites secondaires à effet d'antibiose (**Lemanceau, 1992**).

Selon **Alabouvette et al., 1983**, parmi les différents processus qui conduisent à un antagonisme entre microorganisme, ce sont les phénomènes d'antibiose et d'hyperparasitisme qui ont été les plus fréquemment étudiés par les pathologistes à la recherche des mécanismes microbiologiques utilisables pour la lutte contre les agents phytopathogènes.

La production de métabolites antifongiques, en particulier les antibiotiques dont le plus important est l'HCN, joue un rôle important dans la suppression des champignons. Le cyanure d'hydrogène est un antibiotique produit par les bactéries à Gram négatifs *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, et *Chromobacterium violaceum* (**Askeland et Morisson, 1983**). Selon Pierson et Thomashow (1992), la souche *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 produit principalement deux

antibiotiques majeurs de nature phénazinique : la phénazine-1-carboxylate (PCA) et le 2-hydroxyphénazine-1-carboxylate (2-OH-PCA), et un troisième mineur le 2-hydroxy-phénazine (2-OHPZ) alors que *Pseudomonas fluorescens* 2-79 ne produit que la PCA (**Gurusiddaiah et al., 1986 et Brisbane et al., 1987**).

Nos résultats de test de production des métabolites secondaires, confirment la production des antibiotiques tel que la production de phénazines et d'HCN par les *Pseudomonas* spp. fluorescents.

En effet, la production d'enzymes lytiques extracellulaires peut aussi inhiber la croissance du champignon. Ainsi, l'exposition des phytopathogènes à des enzymes lytiques tels que chitinase, cellulase, glucanase et des enzymes protéolytiques, peut provoquer la dégradation des composés complexes tels que la chitine, les protéines, la cellulose, l'hémicellulose, et les glucanes. Ces composés sont des constituants importants des parois cellulaires de l'agent pathogène, mais aussi des sources de nutrition (Islam et Hossain, 2013).

Nos résultats de test de production des métabolites secondaires, confirment la production des enzymes tel que chitinase et les enzymes protéolytiques par les *Pseudomonas* spp. fluorescents. Les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisées ont fourni une activité importante et influente. Leurs taux d'inhibition vis-à-vis les trois formes spéciales de *Fusarium oxysporum* étaient généralement proches de ceux des souches non lyophilisées. Ce qui signifie que même après la lyophilisation, les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont conservé leur capacité à exercer une activité antagoniste, bien que parfois elle a été remarquablement faible. Il ressort qu'à travers nos résultats, que la lyophilisation n'a pas exercé des effets négatifs sur les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents, et par conséquent sur l'expression des effets bénéfiques des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisées.

La pratique la plus fiable pour lutter contre les agents phytopathogènes et en baissant l'emploi de produits chimiques et le risques qui atteignent l'homme et son environnement est la lutte biologique. Car elle permet une protection à long terme de la culture par l'emploi d'organismes vivants, parmi ces derniers les PGPR. Pour développer cette méthode, des efforts considérables ont été réalisés.

A travers l'étude qui porte sur la viabilité et l'activité antagoniste de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisés vis-à-vis de la fusariose vasculaire, il ressort :

Le dénombrement direct sur boîte de Pétrie montre que la viabilité des quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent a légèrement diminué après la lyophilisation et la conservation. L'utilisation des composés protecteurs (glycérol et maltodextrine) avant la lyophilisation ont permis de maintenir une viabilité peu remarquable à la fin de la lyophilisation et au cours du stockage de *Pseudomonas* spp. fluorescent en comparaison avec les même souches lyophilisées sans agent protecteur.

Les quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent testées ont présenté une stabilité dans la production des métabolites secondaires qui rentrent dans la phytostimulation et le biocontrôle des agents phytopathogènes en comparaison avec les souches non lyophilisés à l'exception de la production d'HCN et de chitinase par les quatre lyophilisats.

Les résultats de test antagoniste *in vitro* réalisé par la méthode de confrontation direct des quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisées en comparaison avec les souches non lyophilisées vis-à-vis des 3 souches fongiques (F.o.a, F.o.l, F.o.ln) sur les trois milieux de culture (PDA, KB et Mixte), ont permis de détecter une stabilité des potentialités inhibitrices.

La lyophilisation reste, à ce jour, la technique la mieux adaptée pour le séchage et la conservation de *Pseudomonas* spp. fluorescents car elle permet l'obtention d'une poudre ayant une viabilité assez élevée. Le dénombrement direct en boîte de Pétri présente une méthode fiable pour l'étude de la viabilité des *Pseudomonas* spp. fluorescents . Il est souhaitable d'utiliser d'autres méthodes qui permettent la précision dans la viabilité des bactéries telles que la cytométrie de flux qui permet la détermination de l'état physiologique cellulaire (cellules viables, cellules mortes et cellules viables mais non cultivables). Le choix et la variation dans les composés protecteurs appropriés sont très importants pour assurer une viabilité élevée des bactéries pendant la lyophilisation et au cours du stockage.

Les souches lyophilisées utilisées présentent des potentialités antagonistes importantes et une grande capacité à produire une large gamme de métabolites secondaires. Cependant, la lyophilisation apparait la technique la plus utilisées en dépit de son cout pour le séchage et la conservation des bactéries en général et *Pseudomonas* spp en particulier car elle est adaptée pour

les souches sensibles à des températures élevées. De plus, elle permet d'obtenir une déshydratation poussée compatible avec des durées de conservation très longues et une manipulation plus facile.

La connaissance de certains paramètres responsables de la perte de viabilité de *Pseudomonas* spp. fluorescents pendant leur lyophilisation et au cours de leur stockage permettra de résoudre le problème lié à leur conservation. Dans le souci d'optimiser la conservation de la poudre lyophilisée de *P. fluorescens*, certaines techniques et voies de recherches doivent être explorées. Nous retenons, parmi elles, l'étude des températures appropriées dans la phase de congélation au cours de la lyophilisation de *Pseudomonas* spp. fluorescents et l'amélioration du rendement de la production de *Pseudomonas fluorescens* en mimant sur les différents milieux de culture et des composés protecteurs.

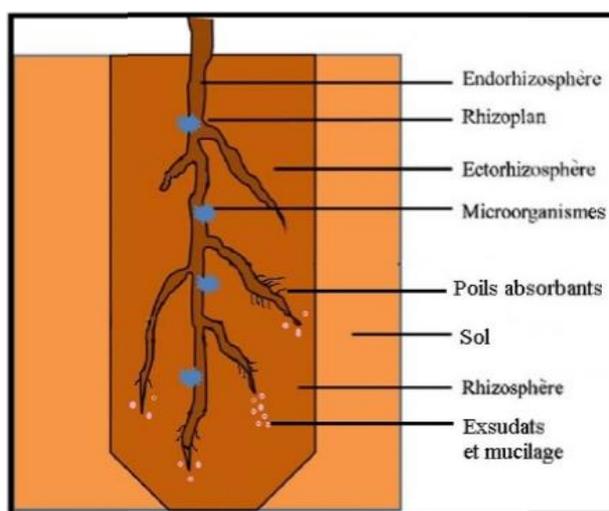
Au terme de notre travail, la poursuite de l'étude sur ces souches est nécessaire pour confirmer d'une part les résultats obtenus *in vitro* par leur application *in situ*, et d'autre part étudier la capacité de ces souches à produire d'autres métabolites secondaires pouvant être impliqués dans la promotion de la croissance des plantes.

## I / Rhizobactéries

### I.1. La rhizosphère

La rhizosphère a été décrite pour la première fois en 1904 par le microbiologiste allemand Hiltner Lorentz. Le terme « rhizosphère » est composé du mot grec « rhiza » pour racine et du mot latin « sphaera » pour cercle d'influence est utilisé pour illustrer la fraction de sol dans laquelle la croissance des microbes est influencée par l'existence du système racinaire (Balzergue, 2013).

En 1949, Clark a suggéré d'utiliser le terme « rhizoplan » pour désigner la surface de la racine. Balandreau et Knowles (1978) ont appelé l'épiderme « l'endorhizosphère » et la zone à proximité immédiate d'épiderme « l'exorhizosphère » (Ashwathi, 2016) (fig01). Dans cette zone typique du sol, les caractéristiques physiques, chimiques et biologiques sont différents du sol distant (région du sol qui n'est pas sous l'influence directe des racines). La limite extérieure de la rhizosphère est floue et dépend du facteur considéré (Seshadri *et al.*, 2015).



**Figure 01** : Diagramme d'une racine et structure de la rhizosphère (Seshadri *et al.*, 2015).

Les communautés microbiennes de la rhizosphère peuvent varier dans la structure et la composition des espèces dans les différentes parties du système racinaire, et cette variation dépend aussi du type du sol, des espèces végétales, de l'état nutritionnel, de l'âge, de la présence d'un stress ou de maladie et d'autres facteurs environnementaux (Reddy *et al.*, 2014).

Un processus majeur dans la rhizosphère consiste en la rhizodéposition, c'est-à-dire, à la libération par les racines de composés organiques divers. Ce phénomène recouvre la production de cellules de la coiffe racinaire, la sécrétion de mucilage et la diffusion passive et contrôlée de composés solubles appelés : exsudats racinaires (sucres, acides aminés et organiques, facteurs de

croissance, etc.) (fig01), qui constituent une source d'énergie essentielle pour les microorganismes du sol et jouent un rôle majeur en écologie microbienne des sols, en stimulant les activités microbiennes et l'ensemble des chaînes trophiques qui en découlent (**Hinsinger, 2010**).

Les bactéries sont les microorganismes les plus abondants et métaboliquement les plus actifs du sol. On estime d'un gramme de sol peut contenir jusqu'à  $10^9$  bactérie par examine microscopique (**Malek, 2015**).

La zone racinaire est un site actif où la compétition microbienne est très efficace entre les rhizobactéries. L'association plante-microbe, exerce sur la croissance des plantes un effet qui peut être positif, neutre ou négatif. Certaines bactéries inhibent la croissance, tandis que d'autres la stimulent. Ces dernières sont alors reprises sous le terme des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Rhizobacteria : PGPR) (**Zahir et al., 2004**).

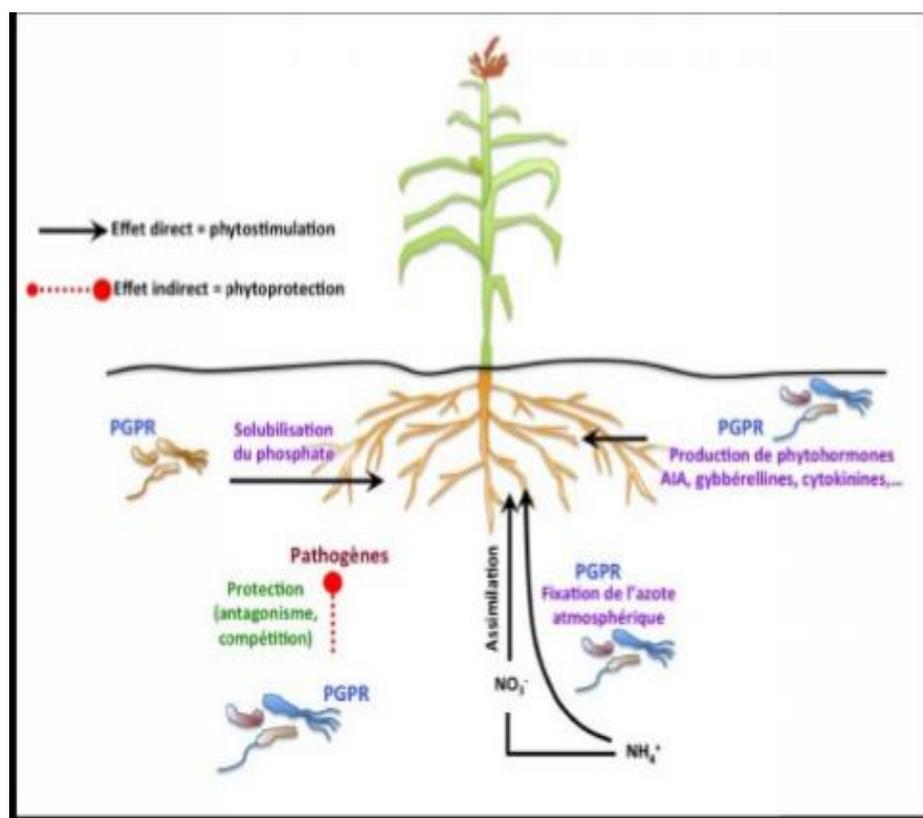
## **I.2. Les PGPR**

Les PGPR ou « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » sont des bactéries qui se développent dans la rhizosphère et qui sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. Pour ces effets on les considère comme rhizobactéries promotrice de la croissance végétale (**Haas et Defago, 2005**).

Ces rhizobactéries colonisent la rhizosphère en utilisant les exsudats racinaires comme substrats nutritifs. A la différence des autres bactéries rhizosphériques, elles ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante via une multitude de mécanismes (**Vacheron et al., 2013**). Par leur action enzymatique, elles solubilisent les éléments nutritifs présents dans les réserves organiques et minérales du sol tels que : le phosphate, l'azote et le fer, et les mettent à la disposition de la plante sous forme d'ions minéraux assimilables à des taux qui correspondent à ses besoins, et ce, aux différents stades de sa croissance. Les ions métalliques sont absorbés par les poils absorbants des racines, se marient au glucose qui remonte vers les organes aériens pour former de nouvelles cellules (**Gagnon, 2015**) (fig02).

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

sont capables de tuer les bactéries compétitives étroitement liées sans pour autant affecter la bactérie productrice (Beneduzi *et al.*, 2012 et Mezaache *et al.*, 2016).



**Figure 02** : Mécanismes phytobénéfiques des PGPR dans la rhizosphère (Khan *et al.*, 2009).

### I.2.2. Potentiel biotechnologique

Utilisées comme outils pour améliorer la croissance des plantes, les PGPR ont plusieurs avantages pratiques elles sont répandues sur les sept continents, ils ne sont pas limités phylogénétiquement (au moins cinq phyla et 24 genres), et la plupart d'entre elles présentent une faible spécificité à l'hôte (Rubin *et al.*, 2017). Les PGPR sont classées en fonction de leurs activités fonctionnelles (Antoun et Prévost, 2005) en :

-**Biofertilisants** : en augmentant la disponibilité des nutriments dans la rhizosphère.

-**Phytostimulants** : par la promotion de la croissance des plantes généralement par les phytohormones.

-**Agents de biocontrôle et de bioremédiation** : en dégradant les polluants organiques et en luttant contre les maladies et atténuer les impacts négatifs des facteurs biotiques principalement par la production d'antibiotiques et de métabolites antifongiques (Tableau01) et des facteurs abiotiques (Ahemad et Kibret, 2013 ; Ngumbi et Kloepper, 2016).

Tableau 01 : Qualités phytobénéfiques de quelques PGPR (Ahemad et Khan, 2011).

PGPR	Molécules à effets PGPR
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IAA ,Sidephores, HCN
<i>Rhizobium</i> sp.	IAA,Sidephores, HCN,ammoniac,exopolysaccharides
Azotobacter	IAA,Sédephores,ammoniac
Pseudomonas, Bacillus	Phosphate solubilization,IAA,Sidephores, HCN,Ammoniac
<i>Klebsiellaoxytoca</i>	IAA,nitrogenasativity Phosphate solubilization
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Antifungalactivity
<i>Bcillus subtilis</i>	Antifungalactivity
<i>Breviabcillus</i> spp.	Zn resistance, IAA
<i>Pseudomonas putida</i>	Sidephores, Pb and Cd resistance
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	IAA, Sidephores, antifugal activity, Phosphate solubilization , Induced systemic resistance,

Sur la base des interactions avec les plantes, ces rhizobactéries varient selon leur degré de proximité à la racine et l'intimité de l'association. En général, les PGPR peuvent être séparés (Gray et Smith, 2004) en :

-**Rhizobactéries symbiotiques**, ils vivent à l'intérieur des plantes et échangent directement des métabolites avec eux.

-**Des rhizobactéries non symbiotiques**, libres, qui vivent à l'extérieur des cellules végétales, tels qu'*Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* et *Pseudomonas*. Ce dernier représente l'un des genres les plus étudiés et abondants du microbiome racinaire (Mendes *et al.*, 2011 et Brown *et al.*, 2012).

## II / *Pseudomonas* spp.fluorescent :

### II.1.Taxonomie

Le genre *Pseudomonas* est découvert en 1894 par Migula, il appartient au phylum des Proteobacteria, classe des Gammaproteobacteria, famille des Pseudomonaceae, ordre des Pseudomonales (Migula, 1894 ; Moore *et al.*, 2006).

Les différentes espèces de *Pseudomonas* sont divisées en cinq groupes selon leur ARNr. Le sous-groupe des *Pseudomonas* fluorescents, appartenant au premier groupe génomique, est certainement le plus étudié. La fluorescence est due à la production d'un pigment fluorescent jaune-vert appelé pyoverdine (Gao *et al.*, 2012 ; Trögl *et al.*, 2012). La plupart étant saprophytes (Bossis *et al.* 2000), principalement l'espèce *P. fluorescens*, *P. putida*, et *P. chlororaphis* (Höfte

et Altier, 2010), sont connues depuis longtemps pour leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaire, quelques espèces comme *P. syringae*, sont phytopathogènes et certaines peuvent causer des infections chez l'humain. Particulièrement *P. aeruginosa*, reconnu comme pathogène opportuniste et causant des infections pulmonaires mortelles chez les patients atteints de fibrose kystique (Mavrodi *et al.*, 2001).

## II.2. Caractéristique générale

Les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas* fluorescentes sont des bacilles à Gram négatif de 0,5 à 1 µm de diamètre sur 1,5 à 5µm de long, asporulées (Bell et Lynch, 2002), fermentant le glucose mais pas le lactose, oxydase positive en forme de bâtonnet avec des flagelles polaires qui lui assurent la mobilité. Elles sont ubiquitaires rencontrées dans les sols, sur les racines des végétaux, sur les plantes, ainsi que dans les eaux douces et marines (Charan *et al.*, 2011). Ce sont des aérobies obligatoires, à l'exception de certaines qui peuvent utiliser le NO<sub>3</sub><sup>-</sup> comme accepteur d'électrons. Elles ont un métabolisme mésophile et chimio-organotrophe oxydatif (Moore *et al.*, 2006). Elles peuvent se développer à un pH neutre et à une température comprise entre 4°C et 43°C (Palleroni, 1984).

Les *Pseudomonas* fluorescentes 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). 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).

## II.3. Applications

De plus qu'elle est utilisée en lutte biologique et comme stimulateur de croissance des plantes PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) (Ongena *et al.*, 2005 ; Anita *et al.*, 2012 et Gao *et al.*, 2012), *Pseudomonas* fluorescent a plusieurs d'autres applications. Elle est également utilisée comme catalyseur dans la réaction de transestérification de l'huile de Jatropha pour la production de biodiesel (Devanesan *et al.*, 2007). *Pseudomonas* fluorescent joue aussi un rôle dans la protection de l'environnement par la dégradation des hydrocarbures et d'autres types de polluants (Moneke *et al.*, 2010). Elle est actuellement étudiée en médecine car elle produit un

antibiotique particulier (mupirocine) qui a prouvé son efficacité dans le traitement de certaines maladies de la peau, des troubles oculaires et auditifs (**Mazereeuw, 2006**).

#### II.4. Mécanismes d'action

Les modes d'action de *Pseudomonas* fluorescent dans la suppression des maladies des plantes sont multiples incluant la production de sidérophores (molécules de faibles poids moléculaires ayant une très forte affinité pour l'ion Fe<sup>3+</sup>) pour la compétition du fer disponible, l'antibiose, et le Système de Résistance Induit (ISR) (**Ongena et al., 2005**).

La grande variété des mécanismes d'action de ces *Pseudomonas*.spp est principalement liée à leur grande capacité à produire une large gamme de métabolites secondaires, habituellement, solubilisation de phosphate, acide indol acétique (IAA), ammoniac, cyanure d'hydrogène (HCN) et production des enzymes dégradant les parois cellulaires impliquée dans la suppression de l'agent pathogène comme la cellulase, la pectinase, la chitinase et la protéase (**Bloemberg et Lugtenberg, 2001 et Van Loon, 2007**). Dans la plupart des cas d'inhibition, le facteur déterminant est la production d'antibiotiques agissant directement sur l'agent pathogène (**Charde et al., 2010**).

##### II.4.1. Action directes

- **Induction de la résistance systémique**

La colonisation des plantes par les *Pseudomonas* spp. fluorescent peut conduire à une réaction d'immunisation permet à la plante une protection contre l'agent pathogènes. Cette « immunisation » de la plante est appelée résistance systémique induite (ISR) (**Jourdan et al., 2008**). L'ISR est généré en réponse à un stimulus externe qui fournit aux plantes une capacité immunitaire défensive. Les mécanismes des ISR incluent : (1) la promotion de croissance, (2) la tolérance physiologique, (3) induction du renforcement des parois cellulaires, et (4) augmentation de la production de phytoalexines, enzymes de défense, antioxydants, proline, protéines apparentées à la pathogénèse, dépôt de lignine et modulation des phénols aux propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (**Jain et al., 2012 ,2013,2015; Singh et al., 2014**).

- **Stimulation de la croissance**

Certaines souches de genres *Pseudomonas*, ont été décrites pour leur effet direct positif sur la croissance des plantes et l'augmentation du rendement de la culture (**Esitken et al., 2002; Dobbelaere et al., 2003; Cakmakciet al., 2006 et Orhan et al., 2006**).

Les *Pseudomonas* fluorescents peuvent favoriser la croissance des plantes hôtes par divers mécanismes tels que la fixation d'azote (N<sub>2</sub>) et la solubilisation d'oligoéléments tels que le phosphate (P) (Cakmakci *et al.*, 2006 ; Orhan *et al.*, 2006), l'inhibition de la synthèse d'éthylène par la plante, la synthèse des phytohormones ou de vitamines (Dobbelaere *et al.*, 2003), et en diminuant la toxicité des métaux lourds (Burd *et al.*, 1998 ; Whipps, 2001).

La sécrétion d'acides organiques et de phosphatases facilitent la conversion de formes insolubles de phosphore en formes disponibles pour les plantes (Kim *et al.*, 1998; Richardson, 2001). Les espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents comme *P. chlororaphis*, *P. putida* et *P. aeruginosa* ont été identifiés comme rhizobactéries solubilisant le phosphate (Cattelan *et al.*, 1999; Bano et Musarat, 2003).

Les *Pseudomonas* fluorescents sont connus pour produire des phytohormones comme l'acide indole-acétique (IAA), les cytokinines, les gibbérellines et les inhibiteurs de la production d'éthylène, ce qui peut augmenter la surface absorbante des racines des plantes pour absorber l'eau et les nutriments (Nihorimbere *et al.*, 2011). Les espèces apparentées à *Pseudomonas* fluorescent peuvent influencer directement l'état physiologique et nutritionnel de la plante qu'elles colonisent avec l'activité d'ACC désaminase (Blaha *et al.*, 2006).

#### II.4.2. Action indirect

- **Compétition trophique**

Dans certains cas, une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (Piano *et al.*, 1997 et Reyes *et al.*, 2004). Les rhizobactéries à croissance rapide tel que les *Pseudomonas* fluorescents pourraient éliminer les pathogènes fongiques par la compétition pour le carbone et les sources d'énergie. *Pseudomonas* fluorescent doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago, 2005). Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant le potentiel colonisateur d'une souche sont la mobilité (présence d'un flagelle) (Jofre *et al.*, 2004).

Le fer est un micronutriment essentiel pour la majorité des organismes de la biosphère. Dans les sols, le fer est disponible souvent sous forme insoluble (ion ferrique ou Fe<sup>+3</sup>). Les microorganismes sont développés des mécanismes pour l'assimilation du fer, y compris la production des molécules appelées sidérophores qui sont des molécules chélatrices du fer, ces

derniers fixent le fer ferrique ( $\text{Fe}^{+3}$ ) et le transforment en sa forme soluble qui est le fer ferreux ( $\text{Fe}^{+2}$ ). Les sidérophores sont impliquées à la fois par voie directe (la plante utilise le fer comme nutriment) et par voie indirecte (par compétition) (Gupta *et al.*, 2015).

- **L'antibiose**

L'antibiose c'est une interaction biologique dont l'un des aspects est l'antagonisme contre les phytopathogènes et la compétition pour les nutriments (Parray *et al.*, 2015). L'antibiose est définie comme « l'inhibition d'un organisme par le produit métabolique d'un autre organisme » (Cook et Baker, 1974). Les produits métaboliques sont de différentes natures comme des enzymes lytiques, des peptides ou protéines antimicrobiens, des composés phénoliques, etc...(Fernando et coll., 2006). La production d'antibiotiques est considérée comme un des mécanismes de lutte biologique les plus puissants contre les phytopathogènes les plus étudiés chez les plantes. Certaines souches sont capables de produire un antibiotique de nature volatile connu sous le nom de cyanhydrique d'hydrogène (HCN) ainsi que des enzymes telle que les chitinases, les glucanases, les protéases, et les lipases pour protéger les plantes du stress biotiques par suppression des pathogènes (Gupta *et al.*, 2015).

De nombreux *Pseudomonas* fluorescents sont capable de produire différents métabolites à activité antibiotiques ou antifongiques, tels que le 2-4 diacétylphloroglucinol (2,4-DAPG), la pyolutéorine, les phénazines, l'HCN et les butyro-lactines (Suty, 2010).

## II.5. Formulation et conservation de *Pseudomonas* fluorescent

Les cellules microbiennes se conservent rarement à l'état natif dans leur milieu de culture. Leur croissance est souvent réalisées en fermenteur dans un substrat liquide mais conservées dans ce milieu après leur croissance, les cellules y consomment les derniers nutriments disponibles et révèlent, pour la plupart, un métabolisme fermentaire qui nuit à la qualité du produit (modification du pH, émanation d'odeurs, etc.). De plus, les cellules, après avoir épuisé leurs réserves, meurent en grand nombre. Il est donc nécessaire de stabiliser la population microbienne et le séchage des cellules apparaît comme une solution pratique (Zhao *et al.*, 2005 ; Coulibaly *et al.*, 2011).

Le séchage des micro-organismes a pour but de leur assurer une conservation optimale, compatible avec la préservation d'une viabilité maximale et rendre ainsi plus économique leur stockage, leur transport et leur commercialisation (Demirhan *et al.*, 2010). Il existe plusieurs techniques de séchage des microorganismes appliquées à l'échelle industrielle, à savoir l'atomisation (Coulibaly *et al.*, 2011), la fluidisation (Li *et al.*, 2004) et la lyophilisation

(Palmfeldt *et al.*, 2003 ; Zhao *et al.*, 2005 ; Coulibaly *et al.*, 2009). Ces méthodes sont assez agressives vis-à-vis des microorganismes puisqu'elles soumettent ces derniers à des variations plus ou moins importantes de température et ou de pression. Par ailleurs, des effets liés au flux d'eau à travers les membranes cellulaires peuvent également être déterminants sur la qualité du produit séché (Coulibaly *et al.*, 2011). La littérature indique que de toutes ces techniques, la lyophilisation apparaît la plus utilisée en dépit de son cout, pour le séchage et la conservation des bactéries en général et des *Pseudomonas* spp. en particulier, car elle est adaptée pour les souches sensibles à des températures élevées (Harrison et Pelczar., 1963 ; Palmfeldt *et al.*, 2003).

### III/La lyophilisation

La lyophilisation est la technique la plus utilisée pour le séchage des *Pseudomonas* spp (Harrison et Pelczar, 1963; Vidhyasekaran *et al.*, 1997 et Palmfeldt *et al.*, 2003). L'intérêt de la lyophilisation est lié au fait que, grâce à la diminution du poids total des bactéries par rapport aux bactéries congelées, les coûts de stockage et de transport sont inférieurs. De plus, les cellules peuvent être stockées à température ambiante pendant plusieurs jours en gardant une stabilité et une viabilité élevée et sont plus facilement manipulables. Cependant, la lyophilisation implique des étapes et des équipements supplémentaires par rapport à la congélation, ce qui la rend plus coûteuse.

La lyophilisation est une méthode qui consiste à sécher un corps imbibé d'eau par l'action conjuguée du froid et du vide, l'extraction de l'eau congelée se fait par la sublimation de la glace ; afin de le rendre stable à la température ambiante et ainsi faciliter son transport et sa conservation (Rey, 1965 ; Palmfeldt *et al.*, 2003). C'est une technique qui permet de conserver l'aspect et les propriétés du produit traité (Perry, 1998). Elle peut avoir lieu naturellement, ou, plus rapidement, dans un lyophilisateur. Elle s'effectue en trois phases majeures (congélation de l'eau, sublimation de la glace et désorption de l'eau de constitution) dans un cycle de lyophilisation.

- La congélation où les produits sont réfrigérés à des températures de l'ordre de -20°C à -80°C ; l'eau se transforme alors en glace (Schuch *et al.*, 2004).
- La dessiccation primaire, sous vide, qui consiste à sublimer la glace libre (interstitielle), donc sans effet d'ébullition (pas d'eau en phase liquide) (Nanasombat et Sriwong, 2007 et Coulibaly *et al.*, 2011).

- La dessiccation secondaire, qui permet d'extraire par désorption les molécules d'eau piégées à la surface des produits séchés (Perry, 1998; Nansombat et Sriwong, 2007 et Colibaly *et al.*, 2011).

### III .1. Impact du séchage sur la viabilité des bactéries

Les bactéries Gram positive résistent mieux à la lyophilisation, comme les bactéries lactiques (Castro *et al.*, 1995 ; Selmer-Olsen *et al.*, 1999 et Nanasombatet *et al.*, 2007), tandis que leurs homologues Gram négative, notamment *Pseudomonas* et *Escherichia coli*, sont très sensibles à toute forme de séchage, surtout en l'absence de composés protecteurs (Louis *et al.*, 1994 ; Palmfeldt *et al.*, 2003). Cette différence de résistance au séchage entre les bactéries Gram+ et Gram- est principalement due à la composition de leur paroi cellulaire. Les travaux réalisés par Palmfeldt *et al.*, (2003) et Stephan *et al.*, (2007) ont montré que le fait de récolter les cellules après la phase stationnaire leur permettait de s'adapter aux conditions de stress et d'améliorer leur viabilité après le séchage, tandis que Jørgensen *et al.*, (1994) ont confirmé qu'il était essentiel pour la survie de *P. fluorescens* que la teneur en eau soit comprise entre 0,2 et 0,4.

Ces techniques de séchage entraînent des dommages à la membrane cellulaire, comme une peroxydation lipidique, une dénaturation des protéines et de l'ADN conduisant à une perte de viabilité (Zhao *et al.*, 2005). Les bactéries séchées sont exposées aux différentes réactions d'oxydation au cours de leur conservation. Les composants cellulaires les plus exposés pendant le séchage et la conservation de *Pseudomonas fluorescens* sont : la membrane plasmique, les acides gras polyinsaturés, les protéines et le glutathion (Mputu *et al.*, 2012a).

- **Modifications de la structure membranaire**

La structure membranaire est la première cible de la détérioration de l'état physiologique des cellules lors d'une situation de stress (Béal *et al.*, 2008), ce qui conduit à une rupture de la paroi cellulaire (Lievens *et al.*, 1994). Le dommage subi par la membrane cytoplasmique est principalement dû à la déshydratation, ce qui a comme conséquence le relargage en solution des composants intracellulaires (cations, nucléotides, enzymes, protéines, etc.) des cellules lyophilisées au cours de leur réhydratation (Lievens *et al.*, 1994).

Chez *P. fluorescens*, la lyophilisation affecte plus l'intégrité membranaire que la conservation ; cette rupture membranaire se traduit par une perte de viabilité au cours du stockage (Mputu *et al.*, 2012b).

- **Peroxydation lipidique**

La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit en présence d'oxygène. Les lipides membranaires sont le seuil d'intenses modifications en vue de maintenir une fluidité et ainsi assurer la perméabilité des membranes cellulaires. Parmi les lipides membranaires, les phospholipides sont responsables de la structure de la bicouche lipidique. Ils possèdent une partie hydrophile (constituée par une molécule de glycérol et de phosphate) et une partie lipophile ou hydrophobe (composée par des acides gras). La partie hydrophobe des phospholipides est liée à la présence des acides gras qui peuvent être saturés ou insaturés. Les acides gras polyinsaturés sont plus exposés aux attaques radicalaires et génèrent des peroxydes lipidiques qui sont très réactifs. Cette peroxydation lipidique fournit une grande variété de produits, dont certains réagissent avec les protéines et l'ADN (Mputuet *al.*, 2012b ; Mputu, 2013).

- **L'oxydation des protéines**

De la même manière que l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine (Levine, 2002; Peng *et al.*, 2000).

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. D'autres lésions irréversibles conduisent à la formation d'un intermédiaire radicalaire. Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine détectables par leur fluorescence, soit subir des coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérées. Les protéines modifiées par oxydation deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Leslie *et al.*, 1995).

- **Domage de l'ADN**

Bien que les dégâts subis par la membrane cellulaire pendant la lyophilisation jouent un rôle essentiel dans la perte de viabilité, les dommages des composants cellulaires (ADN et ARN) affectent considérablement la viabilité des cellules lyophilisées. L'ADN est très sensible au séchage, comme démontré chez *E. coli* (Santivarangkna *et al.*, 2007). Les modifications observées après l'oxydation de l'ADN sont très nombreuses, il s'agit entre autres de la conversion des résidus thymine en thymine glycol et en 5-hydroxyméthyluracile, de la guanine

en 8-hydroxyguanine, l'oxydation du désoxyribose entraîne une coupure des brins (Santivarangkna *et al.*, 2007).

### III.2. La cryoprotection

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 (Lievens *et al.*, 1993 ; Leslie *et al.*, 1995 et Kawahara, 2008). Ces composés protecteurs doivent être peu volatils, solubles dans l'eau et n'avoir aucun caractère toxique au niveau cellulaire. Ils ont des origines diverses : polyols, sucres, protéines laitières, acides aminés, antioxydants ou macromolécules (Béal *et al.*, 2008).

#### ➤ Agents protecteurs

L'utilisation d'agents protecteurs permet de stabiliser les microorganismes pendant la lyophilisation et l'entreposage. Un bon agent protecteur a comme fonctions les suivantes (Zayed et Ross, 2004):

- Assurer une protection aux cellules pendant la congélation ;
- Sécher facilement ;
- Fournir une matrice stable ;
- Faciliter la réhydratation.

Les cryoprotecteurs sont groupés en deux classes selon qu'ils sont à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule. On note cependant les cryoprotecteurs intracellulaires et les cryoprotecteurs extracellulaires.

- **Cryoprotecteurs intracellulaires** : ce sont des substances de faible poids moléculaire qui pénètrent à l'intérieur de la cellule. Ils sont utilisés à une concentration de l'ordre de la mol/l et agissent principalement lors d'une congélation lente. Le plus important représentant de cette catégorie est le glycérol (Halliwell et Chirico, 1993 ; Crowe *et al.*, 2001; Bakhach *et al.*, 2007 et Kawahara, 2008).

- **Cryoprotecteurs extracellulaires** : ce sont des substances de haut poids moléculaire qui se concentrent à l'extérieur de la cellule. Ils sont utilisés à une concentration plus faible, de l'ordre de la 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 (Crowe *et al.*, 2001; Palmfeldt *et al.*, 2003; Nanasombat et Sriwong, 2007 et Coulibaly *et al.*, 2011).

#### IV/ La Fusariose vasculaire

La fusariose vasculaire est l'une des maladies des plantes d'origine tellurique, la plus répandue et dont les incidences sur les cultures sont les plus graves (Nelson *et al.*, 1983). Elle affecte le système vasculaire des plantes (Gindrat, 1975). Celle-ci est connue depuis bien longtemps comme une maladie principale des grandes cultures soit en premier stade de leur germination soit plus tard. Cette maladie se déclare subitement et provoque un flétrissement brutal chez les plantes atteintes (Messiaen, 1981).

L'agent responsable de cette affection est un champignon de l'ordre des hypocréales (*Fusarium oxysporum*) (Marasas *et al.*, 1984). Cet agent n'est pas parasite obligatoire, il est capable en l'absence de la plante hôte de se conserver et de se multiplier dans le sol (Henni, 1998). Ce champignon a la capacité de provoquer des maladies sur de nombreuses espèces végétales cultivées, d'intérêt économique (Armstrong et Armstrong, 1981).

Les souches pathogènes de *Fusarium oxysporum* sont responsables de la pourriture des racines et le flétrissement de plusieurs espèces végétales (Inoue *et al.*, 2002 ; Fravel *et al.*, 2003 et Berrocal-Lobo et Molina, 2007).

L'importance économique de la fusariose est attribuée aux pertes de rendements considérables telles que l'avortement des fleurs, diminution du nombre et du poids des grains et à l'altération de la qualité des grains (Prescott *et al.*, 1987 et Pirgozliev *et al.*, 2003 in Ballois., 2012).

##### IV.1. L'agent pathogène

Le genre *Fusarium* a été décrit par Link en 1809 (Booth, 1985), et sa délimitation actuelle a été faite par Appel et Wollenweber en 1910, et depuis cette année, de nombreux travaux ont été consacrés pour sa taxonomie (Messiaen et Cassini, 1968 ; Booth, 1971 ; Joffe, 1974 et Nelson *et al.*, 1983). Le nom du genre *Fusarium* est tiré du latin « fusus », vu qu'il a des spores en forme de fuseau.

Les champignons du genre *Fusarium* sont ubiquistes, ils s'adaptent facilement à toutes les conditions environnementales et sont très répandus sous tous les climats (Burgess, 1981).

*Fusarium oxysporum* est une espèce fréquente parmi les *Fusarium* du sol, elle peut représenter jusqu'à 70% des isollements de *Fusarium* est couramment dénombrée à 10<sup>3</sup> propagules/g de sol (Messiaen et Cassini, 1981; Larkin *et al.*, 1993 et Ocamb et juzwik, 1995). Cet agent pathogène responsable des dégâts importants dans de nombreuses cultures,

telles que les cultures florales (œillet, cyclamen) et maraîcher sous serres (tomate, melon, concombre), les palmeraies et bananeraies, et les cultures de coton et de lin (**Nelson et al, 1981**).

L'espèce *oxysporum*, peut vivre en saprophyte ou en parasites de vertébrés ou de plantes (**Nelson et al., 1981 et Rebell, 1981, in Bounaga, 1991**). Sa forme parfaite n'est pas encore connue. L'espèce *Fusarium oxysporum* se distingue des autres espèces de *Fusarium* par la production abondante des microconidies, rassemblées en fausse tête qui repose sur des monophialides courtes (**Burgess et Lidell, 1983**).

Seule la reproduction asexuée a été observée chez cette espèce, Ainsi, *Fusarium oxysporum* est considéré comme ascomycète bien que le stade sexuel doit être encore trouvé. Il est proposé d'être plutôt proche du groupe téléomorphique Gibberella que Nectria (**Di Pietro et al., 2003, Michielse et Rep, 2009**).

Le genre *Fusarium* appartient au phylum des Ascomycota, à la classe des Sordariomycetes et à l'ordre des Hypocreales (**Debourgogne, 2013**)

Snyder et Hansen (1940), ont créé de nouveaux taxons des espèces basés sur la spécificité et d'établir ainsi le concept de forme spéciale. Ils sont classés en plus de 150 formes spéciales et races (**Fourie et al. 2011**). La reconnaissance de ces formes spéciales, ne fait appel à aucun critère morphologique mais seulement à la pathogénicité du champignon, dont la détermination doit se faire par la réinoculation du pathogène dans la plante hôte (**Bounaga, 1991**). Les formes spécialisées de *Fusarium oxysporum* s'attaquent à la plupart des plantes cultivées mono et dicotylédones (**El Modafar, 1994**). Quelques exemples sont montrés dans le tableau 01 (Annexe 01).

## IV.2. Caractères de l'agent pathogène

### IV.2.1. Caractères physiologiques

Le milieu favorable au développement de *Fusarium* est à base de pomme de terre (PDA) (**Bouhot et Billotte, 1964**). La croissance commence à 7°C, reste lente jusqu'à 12°C, se produit plus rapidement entre 21 et 27,5°C et s'arrête à 37°C (**Shabaniet Kumar, 2013 et Shabani et al., 2014**). La croissance de ce champignon est faible entre les pH 8,5 et 9,7 et rapide entre les pH 5 et 6 (**Arib, 1998**).

#### IV.2.2. Caractères morphologique

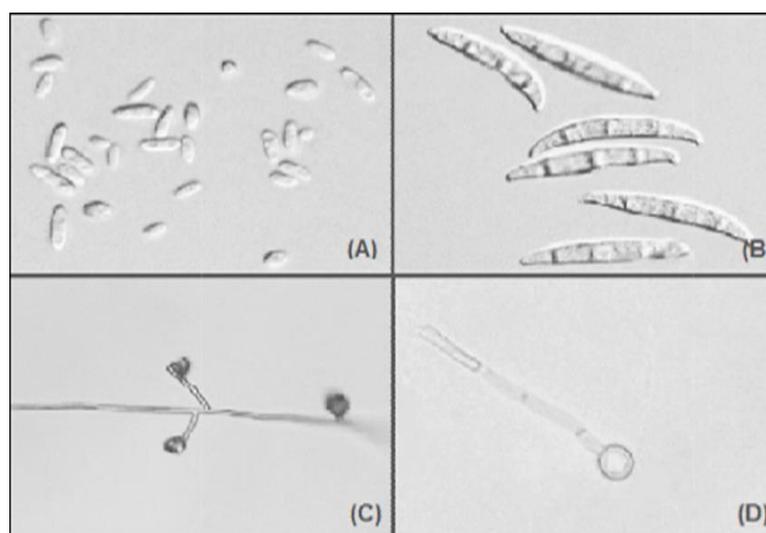
##### ➤ Caractères macroscopiques

Sur PDA, les différentes formes spéciales de *F. oxysporum* peuvent varier d'apparence. Au début de la croissance, le mycélium aérien est généralement blanchâtre et il vire par la suite vers d'autres pigmentations (violette, mauve, orange ou beige, pêche et rose saumon), dues à la formation d'une multitude de spores en surface par des orages fructifères (sporodochies, pionnotes), ainsi qu'aux variations de la lumière (Henni *et al.*, 1994).

##### ➤ Caractères microscopiques

Au niveau microscopique (Komi, 1993) (fig 03), *F. oxysporum* se caractérise par:

- **Microconidies** abondantes généralement monocellulaires, ovales ou réniformes, produites en fausses têtes sur des conidiophores monophialides courts.
- **Macroconidies** fusiformes, également abondantes, comportent quatre à six cellules dont une cellule apicale plus mince que les autres et une cellule basale en forme de pied.
- **Chlamydozspores** solitaires ou en paires, lisses ou rugueuses, globuleuses terminales ou intercalaires de 5 à 15  $\mu\text{m}$  de diamètre, ce sont des organes de conservation, résultant de l'accumulation de réserves dans une région conidie qui se dilate quelque peu et s'entoure finalement d'une membrane épaisse de teinte généralement foncée.



**Figure 03 :** Les caractéristiques morphologiques de *Fusarium oxysporum* (A) microconidies; (B) macroconodies ; (C) microconidies produites par monophialides; et (D) une seule chlamydozspore terminale (Fourie *et al.*, 2011)

- **Les organes massifs producteurs de spores**

-**Les sporodochies** sont des organes fructifères en forme d'axes ramifiés qui portent à leur extrémité les monophialides, donnant naissance aux macroconidies (**Henni, 1998**).

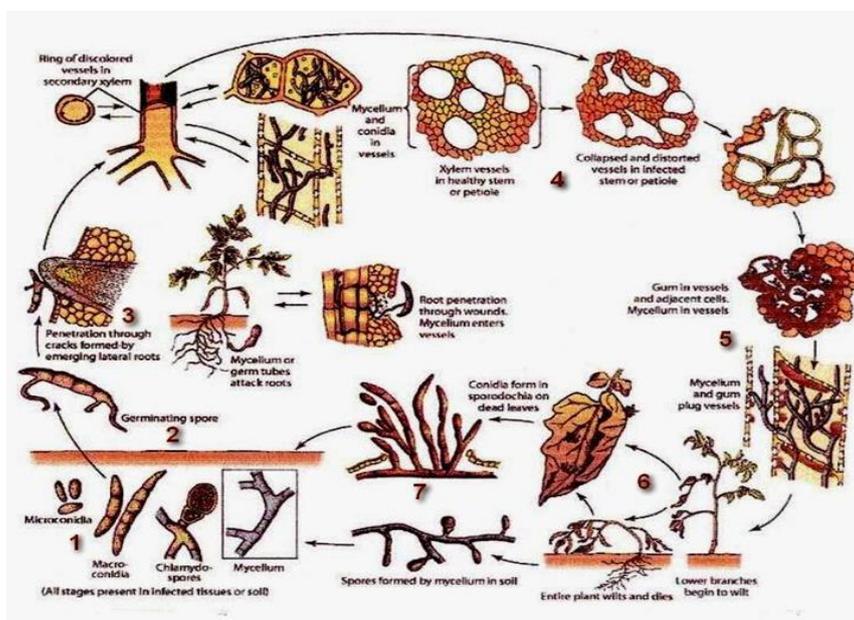
-**Les sclérotés** sont rares, de couleur bleue sombre à noire, ayant un diamètre de 1-2 mm, distribués sur la surface mycélienne ou groupés (**Henni, 1998**).

#### IV .3. Cycle évolutif du *Fusarium oxysporum*

Suivant la présence ou l'absence de la plante hôte, le pathogène au cours de son cycle de vie présente une phase saprophyte et une phase parasitaire (**Nelson, 1981 et Beckman, 1989**) :

- -**La phase saprophyte** : elle est caractérisée par la conservation du champignon au niveau du sol sous forme de Macroconidies, Microconidies et chlamydo-spores, il survit sur la matière organique provenant des débris des végétaux (**Beckman, 1989**).
- -**La phase parasitaire** : en présence de plante hôte, les formes de conservation germent grâce à la stimulation d'exsudats racinaire (**Nelson, 1981**), le filament mycélien pénètre dans la racine et se développe dans le système vasculaire. Cette pénétration est facilitée par les blessures ou par des ouvertures naturelles du système racinaire (**Bounoua, 2008**).

La prolifération du champignon augmente dans les tissus vasculaires et provoque des altérations, tel que le blocage de circulation de la sève. Cette phase se termine par la mort de la plante saprophyte recommence avec la dissémination du champignon (**Nelson, 1981**).



1-Conidies, chlamydo-spores ou mycélium vivant dans le sol.

2-Germination des spores.

3-Pénétration du tube germinatif à l'intérieur des racines.

4-Invasion des vaisseaux par les conidies et/ou mycélium.

5-Production de gomme à l'intérieur des vaisseaux.

6-Flétrissement et mort de la plante.

7-Sporodochies ou mycélium produisant des conidies.

Figure 04 : Cycle de vie de *Fusarium oxysporum* (**Agrios, 2005**).

#### IV.4. Fusariose vasculaire de la tomate

Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) est l'un des légumes les plus populaires et les plus polyvalents. C'est une culture exploitable avec de nombreuses utilisations. Il apporte une contribution significative à la nutrition humaine car il contient des sucres, des acides, des vitamines, des minéraux et des antioxydants (FAO, 2018).

Flétrissure fusarienne de tomate, causé par *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* est l'un des maladies graves les plus répandues de la tomate (Reis *et al.*, 2005 et Sudhamoy *et al.*, 2009).

- Les symptômes

*Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* provoque plusieurs symptômes (Messiaen *et al.*, 1991 et Blancard *et al.*, 2009). Il affecte les jeunes plantes où il occasionne un ralentissement de croissance, le flétrissement et le jaunissement des feuilles basses et les tissus vasculaires seront fortement brunis. Bien que souvent les plantules finissent par se dessécher et mourir. Sur les plantes adultes se sont les vieilles feuilles qui expriment les premiers symptômes et quelques folioles présentent des chloroses sectorielles. Par la suite, le jaunissement gagne l'ensemble de limbe et s'étend à d'autres folioles situées sur le même côté des feuilles (Blancard *et al.*, 2009) (fig 05).



**Figure 05 :** Les symptômes de la flétrissure fusariennea) Jaunissement et flétrissement unilatéral des folioles et des feuilles de la tomateb) Brunissement longitudinal de la tige c)Une coupe longitudinale de la tige montrant le brunissement des vaisseaux (Blancard, 2013).

#### IV.5. Fusariose vasculaire du Palmier Dattier

Le palmier dattier est la troisième plus importante espèce de palmiers (après le cocotier et le palmier à l'huile) dans les industries agroalimentaires en général (Gomez *et al.*, 2009). Il joue à la fois un rôle économique grâce à la production des dattes qui constituent la base de l'alimentation humaine et animale, et un rôle écologique puisqu'il confère sa structure à l'oasis. (Fernandez *et al.*, 1995).

*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* est un pathogène vasculaire qui cause la fusariose vasculaire de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) ou Bayoud, il représente le plus grave problème pour les cultures de Palmier dattier, particulièrement dans l’Afrique du Nord, ce qui conduit à la détérioration de la récolte et au manque de qualité et cela va avoir un impact négatif sur la vie économique et sociale de la population de la région (Jaiti *et al.*, 2007).

- **Les symptômes**

Le premier symptôme de la maladie apparaît sur une feuille de palmier de la couronne centrale. Cette feuille prend une teinte de plomb (couleur gris cendré) puis se rétracte, de bas en haut, d'une manière très particulière : quelques pennées ou épines situées d'un côté de la fronde se dessèchent progressivement de la base vers le sommet. Après qu'un côté a été affecté (fig06 a), le blanchiment commence de l'autre côté, progressant cette fois dans la direction opposée du haut de la fronde à la base. Une tache brune apparaît longitudinalement sur le côté dorsal du rachis et avance de la base à l'extrémité de la fronde, correspondant au passage du mycélium dans les faisceaux vasculaires du rachis. Ensuite, la fronde présente une arche caractéristique, ressemblant à une plume humide et pend le long du tronc. Ce processus de blanchiment et de mort des pennes peut prendre de quelques jours à plusieurs semaines. La palme peut mourir à tout moment de plusieurs semaines à plusieurs mois après l'apparition des premiers symptômes (fig07) (Benzohra *et al.*, 2015).



**Figure 06 :** Les symptômes de Bayoud apparaissent sur une ou plusieurs feuilles de couronne centrale



**Figure 07 :** La palme meurt lorsque le bourgeon terminal est atteint (Béchar) (Benzohra *et al.*, 2015).

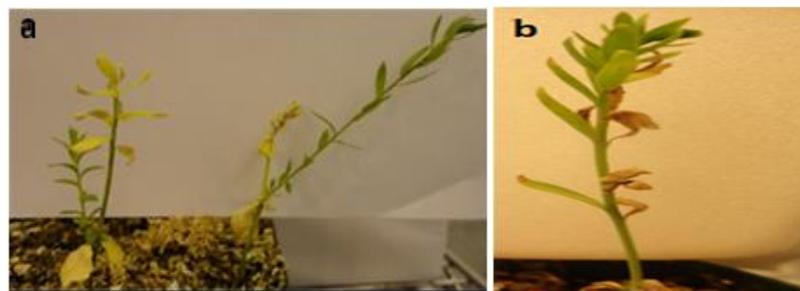
#### IV.6. Fusariose vasculaire de lin

Le lin cultivé (*Linum usitatissimum* L), généralement connu sous le nom de 'lin oléagineux' ou 'alsi' est une culture intensivement cultivée de graine oléagineuse. Il est l'une des cultures cultivées les plus anciennes, développé pour la fibre ou l'huile. La fibre est obtenue à partir de la paille de lin et employée pour faire le papier et la toile, alors que l'huile est atteinte des graines et a été employée dans les industries telles que la fabrication des peintures, du vernis, du tissu d'huile, du linoléum, de l'encre d'imprimerie etc... (Kumar *et al.*, 2014).

Fusariose vasculaire de lin causé par l'espèce de *Fusarium oxysporum* f. Sp *lini* cause la perte significative de rendement. Sans compter que la perte dans le rendement de la semence, elle également réduit la qualité de la graine (Kumar *et al.*, 2014).

- **Les symptômes :**

Les symptômes peuvent apparaitre dès le stade 40 cm avant la formation des boutons floraux jusqu'à la maturité des lins. Quelques plantes éparses montrent un jaunissement unilatéral caractéristique qui affecte d'abord les feuilles situées sur de même lignes d'insertion (fig 08). Ce changement de couleur s'étend rapidement à toutes les autres feuilles et aux plantes avoisinantes. Celles-ci se dessèchent et tombent prématurément. Les tiges prennent une couleur rougeâtre (Agrios, 1988; Smith *et al.*, 1988 et Bert, 2013).



**Figure 08 :** a) Deux semis de lin montrant une flétrissure partielle, avec tige principale infectée et en bonne santé tige latérale, b) flétrissement unilatéral d'une plante de lin où les feuilles d'un côté sont flétries, tandis que l'autre côté est exempt de maladie (Edirisinghe, 2016).

#### V. La lutte contre les fusarioses vasculaires

- **La lutte culturale**

Elle consiste à éviter les conditions qui favorisent la maladie, telles qu'un sol léger et acide, un manque d'azote et de calcium, des températures élevées supérieure à 28°C, un stress thermique et hydrique (excès d'eau) (Blancard, 1997).

- **La lutte agronomique**

Appelée aussi lutte par rotation et compagnonnage. Elle consiste à stopper la culture de la plante qui héberge le parasite pendant plusieurs années, ce qui permet de rompre le cycle du pathogène d'où il ne trouve plus son hôte favorable (Henni, 1994; Besri, 1975).

- **La lutte génétique**

Il s'agit d'introduction de gènes de résistance au niveau des plantes qui deviennent plantes trans-génétiques. Ces gènes sont responsables de la synthèse de protéines éliminatrices du parasite. Cette technique est inefficace par le temps, d'où l'apparition de races plus virulentes et plus résistantes (Henni, 1998).

- **La lutte chimique**

C'est la méthode la plus utilisée à cause de son efficacité mais présente beaucoup d'effets néfastes sur l'environnement et la santé du consommateur, ce qui a conduit ces dernières années à leur remplacement par l'utilisation de bio-fongicides comme lutte biologique. Il s'agit en effet d'une désinfection du sol à l'aide de fongicides chimiques dont les plus utilisés le triazole et ces dérivés qui sont des composés très actifs grâce à leur noyau qui possède une activité pharmacologique, antibactérienne, antifongique et hypoglycémique (Hamoir *et al.*, 2001).

- **La lutte biologique**

La lutte biologique contre les maladies fongiques par des agents microbiens semble être une excellente option, car les effets néfastes secondaires sur l'environnement peuvent être nulle ou minime, en plus de l'avantage d'être en mesure d'exporter des produits à l'étranger sans restriction par rapport à l'utilisation de produits chimiques. L'inhibition des pathogènes par des souches bactériennes rhizosphériques est considérée comme un mécanisme indirect de favoriser de la croissance des plantes (Trivedi *et al.*, 2008)(Tableau02).

**Tableau 02** : les différents microorganismes utilisés en lutte biologique.

Agents de lutte	Références
<i>Aspergillus niger</i>	(Cal <i>et al.</i> , 1995) (Mujeer et Shahana, 2002)
<i>Penicillium digittum</i> <i>Penicillium oxalicum</i>	(Cal <i>et al.</i> , 1995) (Mujeer et Shahana, 2002)
<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viridae</i>	(Alabouvette <i>et al.</i> , 1986) (Michelina <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pseudomonas spp</i>	(Armsrong et Armstrong, 1981) (Benchabane, 2005)
<i>Bacillus subtilis</i>	(El-Mohamedy et Abd El-Baky, 2008) (Shanmugam et Kanoujia, 2011)
<i>Fusarium oxysporum</i> non pathogène	(Armsrong et Armstrong, 1981) (Benchabane, 2005)

- Aditi B.**, (2010). *Siderophore mediated metal uptake by pseudomonas fluorescens and its comparison to iron (iii) chelation*. Maulana Azad College, Aurangabad (M.S), India.9 p.
- Agrios G. N.**, (2005). *Plant Pathology*, 5th ed., Elsevier Academic Press, USA UK.
- Agrios, GN.** (1988). *Plant Pathology*.3rd.ed Academic Press, Inc: Ne York.803.
- Antoun, H. & Prévost, D.** (2005). *Ecology of plant growth promoting rhizobacteria*. In: Siddiqui, Z.A. (Ed.), *PGPR: biocontrol and biofertilization*, Springer, Dordrecht 1-38
- Anita B. & Samiyappan R.**, (2012). *Induction of systemic resistance in rice by Pseudomonas fluorescens against microwave heat treatment*. Korean J. Chem. Eng., 27, 1377-1383.
- Ahemad, M. & Kibret, M.** (2013). *Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective*. Journal of King Saud University-Science 26(01): 1-20
- Ahemad, M. & Khan, M.S.** (2011). *Response of greengram [Vigna radiata (L.) Wilczek] grown in herbicide-amended soil to quizalafop-ethyl and clodinafop tolerant plant growth promoting Bradyrhizobium sp. (vigna) MRM6* J. Agric. Sci. Technol 13: 1209-1222.
- Alabouvette C.**, (1986). *Fusarium wilt suppressive soils from the châteaurenard region: review of 10 year study*. Agronomie, 6, pp 273-284.
- Alabouvette, C., Aimè, S., Cordier, C. and Olivain, C.**, (2008). *Comparative analysis of PR gene expression in tomato inoculated with virulent Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici and the biocontrol strain F. oxysporum Fo47*, Physiological and Molecular Plant Pathology,73, Issues 1-3, p 9-15.
- Alabouvette C., Couteaudier Y. and Louvet J.**, (1984). *Recherches sur la résistance des sols aux maladies. X-Comparaison de la mycoflore colonisant les racines de melons cultivés dans un sol résistant ou dans un sol sensible aux fusarioses vasculaires*, Agronomie, 4: 735.
- Anchisi, M., Gennari, M., Matta, A.** 1985. Retardation of Fusarium wilt symptoms in tomato by pre-and post-inoculation treatments of the roots and aerial parts of the host in hot water. *Physiol. Plant Pathol.* 26: 175-183.
- Alemu F.** (2015). *Isolation of Pseudomonas fluorescens from rhizospheric soil of faba bean and assessment of their Phosphate solubility: in vitro study, Ethiopia*. Dilla University. Sch. Acad. J. Biosci.; 1(7):346-351.
- Anita B. & Samiyappan R.**, 2012. *Induction of systemic resistance in rice by Pseudomonas fluorescens against microwave heat treatment*. Korean J. Chem. Eng., 27, 1377-1383.

**Arib H.**, (1998). *Isolement et caractérisation des Fusarium oxysporum f. sp. Albedinis de la Région de Beni Abbes*. Mémoire pour l'obtention du D.I.E, Institut d'Agronomie, Centre Universitaire de Mascara, pp. 07-08.

**Armstrong, G.N. et Armstrong, J.K.**, (1981). *Formae speciales and races of Fusarium oxysporum causing wilt diseases*, p. 391-399. In P.E. Nelson, T.A. Toussoun, and R.J. Cook (ed.), *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy*. Pennsylvania State University Press, University Park.

**Ashraf M, Ahmad M.S.A, Öztürk M, et Aksoy A.** (2012). *Crop Improvement Through Different Means: Challenges and Prospects*. M. Ashraf et al. (eds.), *Crop Production for Agricultural Improvement*. pp, 1-15.

**Ashwathi, P.** (2016). *Rhizosphere: Origin and Effects*. [En ligne]. <http://www.biologydiscussion.com/soil-microbiology/rhizosphere-origin-and-effects-microbiology/66666>

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

**Bakhach, J., Casoli, V., Guimberteau, J.C.** (2007). The cryopreservation of composite tissues: principle, literature review and preliminary results of our own experiments. *Annales de chirurgie plastique esthétique*, **52**, 531-547.

**Ballois N.**, (2012). *Caractérisation de la diversité des espèces de fusarium et de leur potentiel mycotoxinogène sur céréales françaises*. Master Fage Biologie et Ecologie pour la Forêt, l'Agronomie et l'Environnement. Spécialité. BIPE. 36p.

**Balergue, C.** (2013). *Régulation de la symbiose endomycorhizienne par le phosphate*. Biologie végétale. Université Paul Sabatier-Toulouse III, 2012. *Plant Signaling & Behavior* 6(6): 838p.

**Bano N. and Musarrat J.**, (2003). *Characterization of a new Pseudomonas aeruginosa strain NJ-15 as a potential biocontrol agent*. *Cur. Microbiol.* 46: 324-328.

**Becker, D., R. Stanke, I. Fendrik, W.B. Frommer, J. Vanderleyden, W.M. Kaiser et R Hedrich.**, (2002). *Expression of the NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporter gene LEAMT1; 2 is induced in tomato roots upon association with N<sub>2</sub>-fixing bacteria*. *Planta*, 215: 424-429

**Beckman,C.H.**(1989). Colonisation of the vascular system of plants By fungal wilt pathogens: a basis for modeling the interaction between host and parasite in time and space, in vascular wilt diseases of plants. (tjamos, E,C, et Beckman,C.H.Fds) springer-verlag, Heidelberg, Berlin,pp.19-322.

**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.

**Benchabane M, Toua D, et Ameur D.** (2012). *Exploitation et valorisation des rhizobactéries en biotechnologie végétale : phytostimulation et amélioration de la nutrition des plantes*. Université de Blida. Revue Agrobiologia 2; 17-20.

**Benchabane M, Toua D, et Bensaid F.** (2011). *Action des Pseudomonas spp. fluorescents dans la modulation de la réceptivité du sol à Fusarium oxysporum*. Université de Blida. 34-36.

**Beneduzi A, Ambrosini A and M.P. Passaglia L.** (2012). *Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. Genetics and Molecular Biology, 35, 4 (ppl), 1044-1051.

**Benzohra, I., Megateli, M., Berdja, R.** (2015). *Bayoud disease of date palm in Algeria: History, epidemiology and integrated disease management*.

**Bell-Perkins, L. J., et J.M. Lynch.** (2002). *Rhizosphere microbiology*, p. 2713-2728. In G.Bitton (ed.), Encyclopedia of environmental microbiology, A Wiley-Interscience Publication, Canada.

**Berrocal-Lobo M. and Molina A.**, (2007). *Araïdopsis defense reponse against Fusarium oxysporum*. Trends in Plant Science, 13, (3), pp 145-150.

**Bert, F.**(2013). Les maladies de lin. ARVALIS-Institut du végétal.

**Besri, M.** (1975). *Recherche sur les fusarioses. Influence du précédent cultural sur l'évolution de la population de Fusarium oxysporum dans la rhizosphère de quelques plantes*. 1-8.

**Béal C. et al., 2008.** *Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques*. In : Corrieu G. & Luquet F.-M., eds. Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments. Paris : Tec & Doc Lavoisier, 661-785.

**Bholay A. D., Jadhav Priyanka. U., Borkhataria B. V. and Mayuri V. Dhalkari.,** (2012). *Fluorescent Pseudomonads as Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Their Siderophoregenesis*. K.T.H.M. College, Nashik, M.S, India. 6 p.

**Blaha, D. Prigent-Combaret, C. Mirza, M. S. and MoenneLoccoz, Y.** (2006). "Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography," FEMS Microbiology Ecology, vol. 56, no. 3, pp. 455–470,

- Blancard D.** (2013). *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*. Institut National de recherche agronomique.
- Blancard, D.** (1997). *A Colour Atlas of Tomato Diseases: Observation, Identification and Control*. Edition, New York. 2012 p.
- Blancard D., Laterrot H., Marchoux G., Candresse T.,** (2009). *Les maladies de la tomate: Identifier, connaître, maîtriser*. Quae, Paris, 690 p.
- Bloemberg, G. and B. Lugtenberg,** (2001). *Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria*. Cur. Opin. Plant Biol., 4: 343-350.
- Booth, C.** (1985). *The genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 3ème Edition.
- Booth C.,** (1971). *The genus Fusarium*. Commonwealth, Mycol. Inst. Kew, Surrey, 237 p.
- Bouhot D. et Billotte J. M.,** (1964), *Studies on the ecology of parasitic fungi in the soil II Choise of a nutritive medium for the selective isolation of Fusarium oxysporum and Fusarium solani from the soil*, Ann. Epiphyt.,15 : 45-56.
- Bounaga, N.** (1991). *Le Palmier Dattier, rappels biologiques et problèmes physiologique*. In : Riedcker, A., Dreyer, E., Pafadnam, C., Joly, H. & Bory, G. (Eds.), *Physiologie des Arbres et Arbustes en Zone Arides et Semi-Arides*, Groupe d'Etude de l'Arbre, John Libbey Eurotext, Paris, France, p. 323-336.
- Bounoua M.D.** (2008). *Essai d'utilisation des Pseudomonas spp et des Bacillus spp dans le biocontrôle de fusarium oxysporum f.sp. lycopersici sur tomate et Verticilium Dahlia sur l'olivier*. Thèse Doctorat/ Université d'Oran-Sénia.
- Bric, J. M., Bostock, R. M. and Silverstone, S. E.,** (1991). *Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane*. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 535–538.
- Brisbane, P.G., Janik, L.J., Tate, M.E. and Warren, R.F.O.,** 1987. Revised structure for the phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (NRRL B-15132). Antimicrob. Agents Chemother. **31**: 1967-1971.
- Brown SD., Utturkar SM., Klingeman DM., Johnson CM., Martin SL., LAND ML., Lu T-YS., Schadt CW., Doktycz MJ. and Pelletier DA.,** (2012). *Twenty-one genome sequences from Pseudomonas species and 19 genom sequences from diverse bacteria isolated from the rhizosphère and endosphère of Populus deltoides*. J bacteriol. **194** : 5991-5993.

**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.

**Burd, G.I., Dixon, D.G. and Glick, B.R.** (1998). *A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings*. Appl. Environ. Microbiol. 64(10):3663-3668.

**Burgess L. W. et Liddell C. M.,** (1983). *Laboratory manual for Fusarium research*. University of Sydney, 162 p.

**Burgess, L.W.** (1981). *General ecology of the Fusaria*. In *Fusarium: diseases biology and taxonomy*. (ed. P. E. Nelson, T. A. Toussoun and R. J. Cook), p. 225-235. Pennsylvania State University Press: University Park and London.

**Cal A.D.E, Pascual S., Larena I. and Melgarejo P.,** (1995). *Biological control of Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. Plant Pathology, 44 (5), pp 909-917.

**Cakmakci, R., Donmez, F., Aydin, A. and Sahin, F.** (2006). *Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions*. Soil Biol. Biochem. 38(6):1482-1487.

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

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

**Cattelan, A.J., Hartel, P.G. and Fuhrmann, J.J.,** (1999). *Screening for Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth*. Soil Sci. Soc. Am. J. 63:1670-1680.

**Charde A. & Dawande A.Y.,** (2010). *Purification and characterization of proteinaceous compound from Pseudomonas fluorescens (ATCC948)*. Asiatic J. Biotechnol. Resour.,1,20-22.

**Charan A.R. et al.,** (2011). *Assessment of genetic diversity in Pseudomonas fluorescens using PCR-based methods*. Biorem. Biodivers. Bioavailability, 5, 10-16.

**Choudhary D.K et Varma A.** (2016). *Microbial-mediated induced systemic resistance in plants*.

**Colin G. Scanes and Samuel J.,(1984).***THE ROLE OF GROWTH HORMONES IN THE DOMESTIC FOWL.* Bowen Department of Animal Sciences Rutgers - The State University New Brunswick, NJ 08903, 48-54 pp.

**Cook, R. et Baker, K. (1974).** *Biological control of plant pathogens.* Freeman, San Francisco, CA, USA. 380 pages.

**Coulibaly I. et al., 2011.** Techniques de séchage des starters lactiques et mécanismes affectant la viabilité cellulaire suite à la lyophilisation. *Bitechnol. Agron. Soc. Environ.*,15,287-299.

**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.

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

**Crowe, J.H., Crowe, L.M., Oliver, A.E., Tsvetkova, N.W., W., Tablin, F. 2001.** The Trehalose Myth Revisited: Introduction to a Symposium on Stabilization of Cells in the Dry State. *Cryobiology*, **43**, 89-105.

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

**Debourgogne, A. (2013).** *Typage moléculaire du complexe d'espèces Fusarium solani et détermination de son mécanisme de résistance au voriconazole.* Thèse de doctorat, Université de Lorraine, France.

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

**Devanesan M.G., Viruthagiri T. & Sugumar N., (2007).** *Transesterification of Jatropha oil using immobilized Pseudomonas fluorescens.* *Afr. J. Biotechnol.*, 6, 24972501.

**Di Pietro, A., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J. & Roncero, M. I. G. (2003).** *Fusarium oxysporum: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus* *Molecular. Plant Pathology*, 4, 315-325.

**Digat, B and L. Gardan, (1987).** *Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de Pseudomonas fluorescens et Pseudomonas putida.* *Bull OEPP* 17: 559-568.

- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. and Okon, Y. (2003).** *Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere.* CRC Crit. Rev. Plant Sci. 22(2):107-149.
- Edirisinghe W. H. M. (2016).** *Characterization of Flax Germplasm for Resistance to Fusarium Wilt Caused by Fusarium oxysporum f. sp. Lini.* These. University of Saskatchewan Saskatoon.
- El Modafar, C. (1994).** *Aspects histologiques et biochimiques des interactions hôte-parasites (Platanus spp., Ceratocystis fimbriata f.sp. platani). Réactions associées à la défense de l'hôte.* Thèse Doctorat d'Etat. Université de Montpellier II. Sciences et Techniques du Languedoc. 258p.
- El-Mohamedy R.S.R. and Abd El-Baky M.M. H., (2008).** *Evaluation of different types of seed treatment on control of root rot disease, improvement, growth and yield quality of pea plant in Nabaria province.* Res.J. Aric & Boil.Sci., 4(6): 611-622.
- Esitken, A., Karlidag, H., Ercisli, S. and Sahin, F. (2002).** *Effects of foliar application of Bacillus subtilis Osu 142 on the yield, growth and control of shot-hole disease (Coryneum blight) of apricot.* Gartenbauwissenschaft. 67(4):139–142.
- FAO. (2018).** *Food and Agriculture Organization of the United Nations.* FAOSTAT. Tomato supply chain in Guyana <http://www.fao.org/corp/statistics/fr>
- Fernandez,D. Ouinten, M. Tantaoui A. Geiger, J. P. (1995).** *Le Bayoud du palmier dattier; une maladie qui menace la phoeniciculture.* Phytoma - La défense des végétaux- N° 469 Février.
- Fernando, W., Nakkeeran, S. et Zhang, Y. (2006).** Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. Dans: PGPR: Biocontrol and Biofertilization (Siddiqui, Z.A.), Springer, Dordrecht, The Netherlands. Pp. 67-109.
- Folders. J; Algra. J, Roelofs M. S., Van Loon L C., Tommassen J, and Bitter W. (2001).** *Characterization of Pseudomonas aeruginosa Chitinase, a Gradually Secreted Protein.* Journal of Bacteriology, Vol. 183, No. 24, p. 7044–7052.
- Forlani, G., Pastorelli, R., Branzoni, M. and Favilli, F., (1995).** *Root colonization efficiency, plant growth promoting activity and potentially related properties in plant associated bacteria.* J. Gen. Breeding, 49: 343–352.
- Fourie, G.Steenkamp, E.T. Ploetz, R.C. Gordon, T.R. Viljoen, A. (2011).** *Current status of the taxonomic position of Fusarium oxysporum formae specialis cubense within the Fusarium oxysporum complex.* Infection, Genetics and Evolution 11: 533–542.

**Fravel D ., Oliain C ., and Alabouvette C .,** (2003). *Fusarium oxysporum and its biocontrol*. New Phytologist, 157, pp 493-502.

**Fravel DR .(1988).***Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases*. AnnuRevPhytopatho. 26, 75-91.

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

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

**Gagnon, Y. (2015).** *Le sol et les processus naturels de nutrition des plantes*. Association Manger Santé Bio. [En ligne]. <http://www.mangersantebio.org/18623/le-sol-et-les-processus-naturelsde-nutrition-des-plantes>.

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

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

**Ghomari, F. N.** (2009). *Moyens de Luttés Chimique et Biologique Contre le Fusarium oxysporumf.sp. albedinis Agent Causal du Bayoud Chez le Palmier Dattier Phoenix dactylifera L.* Mémoire de magister. Université d’Oran, Algérie.

**Gindrat, D.** (1975). *La fusariose vasculaire de la tomate de plein champ en Suisse*. Revue suisse de viticulture arboriculture horticulture 7 (2): 69-72.

**Glickmann, E. and Dessaux, Y.,** (1995). *A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 793-796.

**Gomez-Vidal S., Salinas J., Tena M., Lopez-Llorca L.V.,** (2009): *Proteomic analysis of date palm (Phoenix dactyliferaL.) responses to endophytic colonization by entomopathogenic fungi*. Electrophoresis Journal, 2009, 30, pp 2996-3005.

**Gravel, V., Antoun, H. and Tweddell, R.J.,** (2007). *Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with Pseudomonas putida or*

- Trichoderma atroviride*: Possible role of Indole Acetic Acid (IAA). Soil Biol. Biochem. **39**: 1968-1977.
- Gray E.J., and Smith D.L.,** (2004). *Intracellular and extracellular PGPR : commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes*. 37 (3), pp 395-412.
- Grewal J.S., Mahendra pal and Kulshrestha D.D.,**(1974). *A new record of wilt gram caused by Fusarium solani*. Current science 43:767 p.
- Grobelak A, Napora A et Kacprzak M.** (2014). *The impact of plant growthpromotingbacteria (PGPB) on the development of phytopathogenic fungi*. FoliaBiologica et Oecologic. 10, 107–112.
- Guan, L.L., Kanoh, K. and Kamino, K.,** (2001). *Effect of Exogenous Siderophores on Iron Uptake Activity of Marine Bacteria under Iron-Limited Conditions*. Applied and Environmental Microbiol 67 (4): 1710-1717.
- Gupta G, Singh Parihar S, Kumar Ahirwar N, Kumar Snehi S et Singh V. (2015).** *Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture*. J Microb BiochemTechnol. Volume 7(2), 96-102.
- Gurusiddaiah, S., Weller, D.M., Sarkar, A. and Cook, R. J., 1986.** Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium* spp. Antimicrob. Agents Chemother. 29:488-495.
- Haas, D. and Defago, G. (2005).** *Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads*. Nat. Rev. Microbiol. 3(4):307-319.
- Haas, D., and C. Keel. (2003).** *Regulation of antibiotic production in root-colonizing Pseudomonas spp. and relevance for biological control of plant disease*. Annu Rev Phytopathol 41:117-153.
- Haas, D., Keel, Laville, L., Maurhofer, M., Oberkanoli, T., Schneider., Voisard,C., Wuthrich,B., and Défago,G.(1991).** *Secondary metabolites of Pseudomonas fluorescens strain CHAO involved in suppression of root diseases pp.450-556*. In H. Hennecke and D.P.S. Verma.ed., *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*. Kluwer Academic Dordrecht, Netherlands.
- Halliwell, B., Chirico, S. 1993.** Lipid peroxydation: its mechanism, measurement and significance 1-3. *Am J Clin Nutr*, **57**, 715S-725S.
- Hamini, N. (2010).** *Diversité génétique des populations de Fusarium pathogène de la tomate sur le pourtour méditerranéen*. Thèse de Doctorat. Université d’Oran. 161 p.108)

**Hamoir, J., Goret, M., Mignon, B., and Gustin, P.** (2001). *Actualité sur les antifongiques enregistrés en Belgique dans le cadre du traitement des dermatophytoses*. Ann. Med. Vet.145 :226-232.

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

**Henni J.E,** (1998). *Morphologie, pouvoir pathogène et diversité génétique chez Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. Thèse de Doctorat d'état. Université d'Oran. 171p.

**Henni J. E., Boisson C. et Geiger J. P.,** (1994). *Variabilité de la morphologie chez Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. Phytopathol. Medit., 33: 51-58.

**Hinsinger, P.** (2010). *Les racines au cœur du fonctionnement de la rhizosphère, Des connaissances pointues issues de la recherche aux applications possibles en AB (Montpellier SUPAGRO - CIRAD - INRA - IRD)*, Alter Agri 101: 8-20.

**Höfte, M., et N. Altier.** (2010). *Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems*. Res. Microbiol. 161: 464-471.

**Inoue I ., Namiki F., and Tsuge T.,** (2002). *Plant colonization by the vascular wilt Fungus Fusarium oxysporum Requires FOW1, a Gene Encoding a Mitochondrial Protein*. The Plant Cell, 14, pp 1869-1883.

**Islam M.T et Hossain M.M.** (2013). *Biological Control of Perono sporomycete Phytopathogen by Bacterial Antagonist*. Maheshwari D.K. (eds.), Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management, pp. 176-218.

**Jain, A. Singh, A. Singh, S. and Singh, H. B.** (2015). *“Biological management of Sclerotinia sclerotiorum in pea using plant growth promoting microbial consortium”* journal of Basic Microbiology, vol.55,no.8,pp.961–972,

**Jain, A. Singh, A. Singh, S. and Singh, H. B.**(2013). *“Microbial consortium-induced change sin oxidative stress marker sinpea plants challenged with sclerotinia sclerotiorum,”* Journal of Plant Growth Regulation, Vol. 32, N°.2, pp.388–398.

**Jain, A. Singh, S. Kumar Sarma, B. and Singh, H. B.** (2012). *Bahadur Singh, “Microbial consortium-mediated reprogramming of defence network in pea to enhance tolerance against Sclerotinia sclerotiorum.”* Journal of Applied Microbiology, vol. 112, no. 3, pp. 537–550.

**Jain A, Singh, A. Singh, S. Sarma, B.K.and Singh, H.B.** (2015). *“Biocontrolagents mediated suppression of oxalic acid induced cell death during Sclerotinia sclerotiorum-pea interaction,”* Journal of Basic Microbiology , vol. 55,no.5,pp.601–606.

**Jaiti, F. Meddich, A. El Hadram, I.** (2007). *Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in the protection of date palm (Phoenix dactylifera L.) against bayoud disease*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71; (4–6): 166–173.

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

**Joffe, A. Z.** (1974). *A modern system of Fusarium taxonomy*. *Myco pathol. Mycol. Appl.*, 53, 201-228.

**Jofre, E., Lagares, A. and Mori, G.** (2004). *Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 231(2):267-275.

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

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

**Jourdan, E., Ongena, M. et Thonart, P.** (2008). *Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les Rhizobactéries non pathogènes*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12, 437-449.

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

**Karnwal A.** (2009). *Production of indole acetic acid by fluorescent Pseudomonas in the presence of L-tryptophan and rice root exudates*. *Journal of Plant Pathology*.

**Kaur R., Kaur J. and Singh R. S.,** (2010). *Nonpathogenic Fusarium as a Biological Control Agent*. *Plant Pathology Journal*, 9: 79-91.

**Kawahara H.** (2008). *Cryoprotectants and ice-binding proteins*. In: Margesin R. et al., eds. *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*. Berlin, Heidelberg, Germany : Springer-Verlag, 229-243.

**Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A., Oves, M.,** (2009). *Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils*. *Environ. Chem. Lett.* 7, 1–19.

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

**Kim, K.Y. and McDonald, G.A., 1998.** Effect of phosphate solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. Fert. Soils 26: 79-87.

**King, E.O., M.K. Ward, et D.E. Raney.** (1954). *Two simple methods for the determination of pyocyanin and fluorescin.* J. Lab. Clin. Med. 44: 303-304

**Kishore, G.K., Pande, S. and Podile, A.R.,** (2005). *Biological control of late leaf spot of peanut (Arachis hypogaea L.) with chitinolytic bacteria.* Phytopathol. 95:123–132.

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

**Komi, A.** (1993). *Pouvoir pathogène et diversité génétique chez Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum(ATK) SN. Et H.: Agent de la fusariose du cotonnier.* Thèse de doctorat d'état. Université de Montpellier II. Sciences et Techniques du Languedoc.

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

**Kumar A, Patel JS, Bahadur I, Meena VS** (2016). *Les mécanismes moléculaires de KSM pour l'amélioration de la production agricole en agriculture biologique.* Dans:Meena VS, Maurya BR, JP Verma, Meena RS (eds) Microorganismes potassiques solubilisants pour l'agriculture durable. Springer, Inde, pp 61-75.

**Kumar M, Tripathi UK, Tomer A, Kumar P, Singh A.**(2014). *Screening of Linseed Germplasm for Resistance/Tolerance against Fusarium oxysporum F Sp. Lini (Bolley) Disease.* Plant Pathology Microbiology Vol 5: 235.

**Larkin R. P; Hopkins D. L and Martin F. N,** (1996). *Suppression of Fusarium wile of watermelon by nopathogenic Fusarium oxysporum and other microorganism receoveres from a disease suppressive soil.* Phytopathology 86: 812-819.

**Lemanceau, P.,** (1992). *Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des Pseudomonas spp.fluorescent.*Agronomie. revue12 ,413-437.

**Leslie S.B. et al.,** (1995). *Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying.* Appl. Environ. Microbiol., 61, 3592-3597.

- Levine, L.R.** 2002. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, **32**(790-796).
- Li J. et al.,** 2004. *Fluidized-bed drying of biological materials: two cases studies*. *Chin. J. Chem. Eng.*, 12,840-842.
- Lievens L.C. & van't Riet K.,** (1994). *Convective drying of bacteria. Factors influencing survival*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*, 51, 71-89.
- Lievens L.C. & van't Riet K.,** (1993). *Convective drying of bacteria. The drying process*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 50,45-63.
- Lodish H, Berk A, Zipursky L.S, Matsudaira P, Baltimore D, and Darnell J.**(2000). *Molecular Cell Biology*. 4th edition. ISBN-10: 0-7167-3136-3.
- Louis P., Trüper H.G. & Galinski E.A.,** (1994). *Survival of Escherichia coli during drying and storage in the presence of compatible solutes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41,684-688.
- 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.
- MAOC.** Ministère de l'Agriculture de l'Ontario-Canada. (2006). *Profil de la culture des tomates de serre au Canada*.
- Marasas, W.F.O., Nelson, P.E and Toussoun, T.A.,** (1984). *Toxigenic Fusarium species*. *Pennsylvania State University provs*. University Park.254 pp.
- Mavrodi, O.V., McSpadden Gardener, B.B., Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Weller, D.M. and Thomashow, L.S.,** (2001). *Genetic diversity of phlD from 2,4diacetylphloroglucinol-producing fluorescent Pseudomonas species*. *Phytopathol*. 91: 35–43.
- Mazereeuw-Hautier J.,** (2006). *Formation médicale continue : impétigo*. *Ann. Dermatologie Vénérologie*, 133,194207.
- Mendes R., Kruijt M., de Bruijn I., Dekkers E., van der Voort M., Schneider JHM., Piceno YM., DeSantis Tz., Andersen GL. and Bakker PAHM.,** (2011). *Deciphering the rhizosphère microbiome for disease-suppressive bacteria*. *Science* 332 : 1097-1100.
- Messiaen C.M,** (1981). *Les variétés résistantes. Méthodes de lutte contre les maladies et ennemies des plantes*. Edition IRA. Paris. 374p.
- Messiaen C.M, Blancard D., Rouxel F. et LafonR.,** (1991). *Les Maladies des plantes maraîchères : 3<sup>ème</sup> ed* INRA, Paris, 552 p.

- Messiaen C.M et Cassini R**, (1981). *Ttaxonomy of Fusarium*. In «*Fusarium; Disease, Biology and Taxonomy*». Pennsylvania State University Park. pp 427-445
- Messiaen, C.M. et R. Cassini**, (1968). *Recherche sur les fusarioses. IV-La systématique Fusarium*. Ann. Epiphyt. 19, 387-454.
- Mezaache, S.** (2012). *Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de Pseudomonas isolées de rhizosphère de la pomme de terre*. Doctorat en Sciences .Université Ferhat ABBAS Sétif.
- Mezaache, S.A., Haichour, N., Guechi, A. & Zerroug, M.** (2016). *Bacteriocins Contributing in Rhizospheric Competition among Fluorescent Pseudomonas*. Annual Research & Review in Biology 11(4): 1-9.
- Mendes R., Kruijt M., de Bruijn I., Dekkers E., van der Voort M., Schneider JHM., Piceno YM., DeSantis Tz., Andersen GL. and Bakker PAHM.,** (2011). *Deciphering the rhizosphère microbiome for disease-suppressive bacteria*. Science 332 : 1097-1100.
- Meyer, J. M., Mock, M. and Abdallah, A.** 1979. Effect of iron on the protein composition of the outer membrane of fluorescent pseudomonads. FEMS Microbiol. Lett., 5: 395-523.
- Meyer JM, Abdallah MA.** (1978). *Fluorescent Pigment of Pseudomonas fluorescens-Biosynthesis, purification and physicochemical properties*. Journal of General Microbiology 107:319-328.
- Meyer, J. M.** 1977. *Pigment fluorescent et métabolisme du fer chez Pseudomonas fluorescens*. Thèse de Doctorat d'Etat, Strasbourg.
- Michelina, R., Massimo, G, Oscar, A., Bernard., Jurgen, K. and Philippe, N.,** (2011). *Lutte biologique ;tomate* . Food Quality and Safety 6TH Framework Programme, p 5.
- Michielse, C. B. & Rep, M.** (2009). *Pathogen profile update: Fusarium oxysporum*. Molecular Plant Pathology , 10, 311-324.
- Migula, W.** (1894). *Über ein neues System der Bakterien*. Arbeiten aus dem bakteriologischen Institut der technischen Hochschule zu Karlsruhe, 1235-238.
- Miraza, M S., W. Ahmed, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand et KA. Malik** (2001). *Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micropropagated sugarcane in vitro*. Plant Soil, 237:47–54.
- Moneke A.N.,Okpala G.N. & Anyanwu C.U.,** (2010). *Biodegradation of glyphosate herbicide in vitro using bacterial isolates from four rice fields*. Afr. J. Biotechnol., 9, 4067-4074.

**Moore, E.R.B., Tindall, B.J., Martins Dos Santos, V.A.P., Pieper, D.H., Ramos, J.L., et Palleroni, N.J.** (2006). *Nonmedical : Pseudomonas, Prokaryotes*, Springer, USA. P 646- 703.

**Morgan C.A., Herman N., White P.A. & Vesey G.,** (2006). *Preservation of microorganisms by drying*. J. Microbiol. Methods, 66, 183-193.

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

**Mputu K. J.-N.,** (2013). *Optimisation of production of Pseudomonas fluorescens. Accelerated study of storage and oxidation test*. Saarbrücken, Germany : Lambert Academic Publishing.

**Mputu K J-N , Pierart C, Destain J, Noki Ph. and Thonart Ph .,** (2014) : *Impact du séchage sur la viabilité de Pseudomonas fluorescens*. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment. Belgique. Biotechno.14-25.

**Mputu K. J.-N. et al.,** (2012a). *Effects of glycerol on Pseudomonas fluorescens BTP1 freeze-dried*. Int. J. Biotechnol. Biochem., 8, 245-258.

**Mputu K. J.-N. et al.,** (2012b). *Impact of protective compounds on the viability, physiological state and lipid degradation of freeze-dried Pseudomonas fluorescens BTP1 during storage*. Int. J. Biotechnol. Biochem., 8,17-26.

**Munees A, Mulugeta K,** (2014) .*Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective*, Journal of King Saud University–Science, Vol 26, 1, pp1–20.

**Mujeebur, R.K. and Shahana, M.K.,** (2002). *Effects of root-dip treatment with certain phosphate solubilizing microorganisms on the fusarial wilt of tomato*. Bioresource technology. 85, 213-215.

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

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

**Nelson, P. E., Tousson T. A. & Marasas, W. F.** (1983). *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. Penn. Stat. Univer. Press.,193 p.

- Nelson, P. E., Tousson, T. A. & Cook, R. K. J.** (1981). *Fusarium Diseases, Biology and Taxonomy*. Penn. Stat. Univ. Press., 457 p.
- Nene Y.L., Haware M.P., and Ready. M.,** (1979). Diagnosis of some chickpea (*Cicer arietinum*). ICRISAT Information bulletin, 3: 1-44p
- Ngumbi, E., Kloepper, J.** (2016). *Bacterial-mediated drought tolerance: Current and future prospects*. *Applied Soil Ecology* 105(2016): 109-125
- Nihorimbere, V. Ongena, M. Smargiassi, M. and Thonart, P.**(2011) “*Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health,* ”*Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, vol.15,no.2,pp.327–337.
- Oberhansli T, G. Défago. , Haas, D.** (1991). *Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHAO of Pseudomonas fluorescens: role of tryptophan side chain oxidase*. *Journal of General Microbiology* (1991), 137, 2273-2279.
- Ocamb C.M et Juzwik J,**(1995). *Fusarium species associated with rhizosphere soil and diseased roots of eastern white pine seedlings and associated nursery soils*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 17, 325-330.
- Ongena, M., Jacques, P., Delfosse, P. and Thonart, P.** (2002). *Unusual traits of the pyoverdinin-mediated iron acquisition system in Pseudomonas putida strain BTP1*. *Biometals*. 15(1):1-13.
- Ongena M. et al.,** (2005). *Isolation of an N-alkylated benzylamine derivative from Pseudomonas putida BTP1 as elicitor of induced systemic resistance in bean*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 18, 562-569.
- Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M. and Sahin, F.** (2006). *Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry*. *Sci. Hortic.* 111(1):38-43.
- O’Sullivan, D.J., and O’Gara, F.** 1992. *Traits of fluorescent Pseudomonas spp. Involved in suppression of plant root pathogens*. *Microbiol Rev.*56 , 662-676.
- Palmfeldt J., Radström P. & Hahn-Hägerdal B.,** (2003). *Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of Pseudomonas chlororaphis*. *Cryobiology*, 47,21-29.
- Palleroni, NJ.** (1984). *Gram negative aerobic rods and cocci : family Pseudomonadaceae*, *William and Wilkens*. Baltimore, 141 – 168.

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

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

**Park K.-H, Lee C.-Y. and Son H.-J.** (2009). *Mechanism of insoluble phosphate solubilization by Pseudomonas fluorescens RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities.* Pusan National University, Miryang, Korea. Applied Microbiology 0266-8254.

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

**Patil. C et al.** (2016). *Metabolomics approach to evaluate resilience of soil after treatment with natural herbicide.* 13th International Conference on Protection and Restoration of the Environment, Mykonos island, Greece (Oral).

**Patten, C.L. and Glick, B.R.,** (2002). *Regulation of indoleacetic acid production in Pseudomonas putida GR12-2 by tryptophan and the stationary phase sigma factor RpoS.* Can. J. Microbiol. 48: 635-642.

**Paul D et Narayan Sinha S.** (2016). *Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium Pseudomonas aeruginosa KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India.* University of Kalyani. annals of agrarian science 15:130-136.

**Peix .A, Rivas-Boyerro.A.A, Mateos.P.F, Rodriguez-Barrueo.C, Martinez-Molina.E, Velazquez.E.**(2001). *Growth promoting of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of Mesorhizobium mediterraneum undergrowth chamber conditions.* Soil Biology and Biochemistry 33,103-110.

**Pembrey R.S., Marshall K.C. & Schneider R.P.,** (1999). *Cell surface analysis techniques: what do cell preparation protocols do to cell surface properties?* Appl. Environ. Microbiol., 65, 2877-2894.

**Peng, J., Jones, G.L., Watson, K. 2000.** Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. *Free Radical Biology and Medicine*, **28**, 1598-1606.

**Perneel, M. Heyrman, J. Adiobo, A. De Maeyer, Raaijmakers, K. J.M. De Vos<sup>2</sup> and P. Hofte M.** (2006). *Characterization of CMR5c and CMR12a, novel fluorescent Pseudomonas strains from the cocoyam rhizosphere with biocontrol activity*. Laboratory of Phytopathology ;Ghent University. Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072.

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

**Perry, S.F.** 1998. Freeze-Drying and Cryopreservation of Bacteria. *Molecular Biotechnology*, **9**, 59-64.

**Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, Q. and Gullino, M.L.** (1997). *Biocontrol capability of Metschnikowia pulcherrima against Botrytis postharvest rot of apple*. Postharvest Biol. Technol. **11**(3):131-140.

**Pierson, LS, III et Thomashow, L.S.** (1992). Clonage et expression hétérologue du locus biosynthétique de la phénazine de *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. Mol. Plant-Microbe Interagir. **5**: 330-339.

**Pirgozliev SR., Edwards SG., Hare MC. et Jenkinson P.,** (2003). *Strategies For the control of Fusarium head blight in cereals* / European Journal of Plant Pathology. 109.731–742

**Prescott JM., Burnett PA., Saari EE., Ransom J., Bowman J W., Milliano do., Singh RP. et Bekele G.,** (1987). *Maladies at ravagours du blé : Guide d'identification au champ*. CIMMYT. Mexico, D.F., Mexico. 135p.

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

**Ramyasmruthi S , Pallavi O, Pallavi S, Tilak K et Srividya S.**(2012). *Métabolite chitinolytique et secondaire produisant Pseudomonas fluorescens isolés de la rhizosphère de Solanaceae efficace contre phytopathogènes fongiques à large spectre*. Journal asiatique des sciences végétales et de la recherche, **2** (1): 16-24.

**Rebell, G.** (1981). *Fusarium infections in human and veterinary medicine*. In: *Fusarium : Diseases, Biology and Taxonomy*. (Eds.) Nelson, P. E., Tousson, T. A. & Cook, R. J. The Penn. State Univ. Press. Univ. Parck and London

**Reddy, M.S., Ila, R.I. & Faylon, P.S.** (2014). *Recent Advances in Biofertilizers and Biofungicides (PGPR) for Sustainable Agriculture* , Cambridge Scholars Publishing. 540p.

**Reetha A.K, Pavani S.L and S.Mohan.** (2014). *Hydrogen Cyanide Production Ability by bacterial antagonist and their Antibiotics Inhibition Potential on Macrophomina phaseolina (Tassi.) Goid.* International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. ISSN: 2319-7706 Vol 3, N°5, pp. 172-178.

**Reis, A., Costa, H., Boiteux, L.S., Lopes, C.A.** (2005). *First report of Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici race 3 on tomato in Brazil.* Fitopatologia Brasileira 30:426-428.

**Renwick, A., Campbell, R. and Coe, S.,** (1991). *Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of Gaeumannomyces graminis.* Plant Pathol. **40**: 523-532.

**Reyes, M.E.Q., Rohrbach, K.G. and Paull, R.E.** (2004). *Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit.* Postharvest Biol. Technol. 33(2):193-203.

**Rey, L. 1965.** Un développement nouveau de la lyophilisation: La cryodessiccation des systbmes non aqueux. . *Experientia*, **21**, 241-304.

**Richardson, A.E.,** (2001). Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants Aus. J. Plant Physiol. 28(9): 897–906.

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

**Saharan B.S. et Nehra V. (2011).** *Plant Growth Promoting Rhizobacteria.* A Critical Review. Life Sciences and Medicine Research, Volume 2011: LSMR-21.

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

**Santivarangkna C., Wenning M., FoerstP.& Kulozik U.,**(2007).*Damage of cell envelope of Lactobacillus helveticus during vacuum drying.* J. Appl. Microbiol., 102, 748-756.

**Sayyed R.Z , Badgujar M.D, Sonawane H.M, Mhaske M.M. and Chincholkar S.B.,** (2004). *Production of microbial iron chelators (sidérophores) by fluorescent Pseudomonads.* Mooljee jaitha college.Jalguan.425.002.India.7 p.

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

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

**Seifert, K. A.** (2001). *Fusarium anamorphic generic concepts*. In: *Fusarium*. (Eds. Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L. & Burgess L. W), APS Press St. Paul, USA.

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

**Seshadri, B., Bolan, N.S. & Naidu, R.** (2015). *Rhizosphere-induced heavy metal (loid) transformation in relation to bioavailability and remediation*, *Centre for Environmental Risk Assessment and Remediation*, University of South Australia, *M Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 15(2): 524-548

**Shabani F, Kumar L** (2013). *Risk levels of Invasive Fusarium oxysporum f. sp. albedinis in Areas Suitable for Date Palm (Phoenix dactylifera) Cultivation Under Various Climate Change Projections*. *PLoS ONE*, 8: 483-404.

**Shabani F, Kumar L, Esmaeili A** (2014). *Future Distributions of Fusarium oxysporum f. spp. in European, Middle Eastern and North African Agricultural Regions under Climate Change*. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 197: 96-105.

**Sharma, A., and Johri, B.N.,** (2003). *Combat of iron-deprivation through a plant growth promoting fluorescent Pseudomonas strain GRP3A IN MUNG BEAN .Vigna radiata L. Wilzeck*. *Microbiol Res.* **158**, 77-81.

**Shanmugam ,V . and Kanoujia, N.,** (2011). *Biological management of vascular wilt of tomato caused by Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici by plant growth-promoting rhizobacterial mixture*. *Biological Control.* 57, Issue 2, p 85-93.

**Shilev S ,** (2013). *Soil Rhizobacteria Regulating the Uptake of Nutrients and Undesirable Elements by Plants*. *Chapitre 5 plant microbe symbiosis fundamentals and advance* naveenkumararora editor.

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

**Singh, A. Jain, A. Sarma, B.K. Upadhyay, R.S. and Singh, H.B.** (2014). "Rhizosphere competent microbial consortium mediates rapid changes in phenolic profiles in chickpea during Sclerotium rolfsii infection," *Microbiological Research*, vol. 169, no. 5-6, pp. 353– 360,

**Singh M, Dotaniya ML, Mishra A, Dotaniya CK, Regar KL, Lata M** (2016). *Rôle des biofertilisants dans l'agriculture de conservation*. Dans: Bisht JK, Meena VS, PK Mishra, Pattanayak A (eds) *L'agriculture de conservation: une approche pour lutter contre le changement climatique dans l'Himalaya indien*. Springer, Singapour, pp 113-134.

**Snyder, W. C., et Hansen, H.N.** (1940). *The species concept in Fusarium*. Amer. J. Bot., 27: 64-67.

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

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

**Sreedevi B, Preethi S. and Pramoda Kumari J.,** (2014). *Isolation, Production And Optimization Of Siderophore Producing Pseudomonas From Paddy Soil*. Sri Venkateswara University, Tirupati, A.P-517502, India. 18 p.

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

**Suganthi, M. Arvinth S, Raj Kumar R. and Chandrashekara K.N.**(2015). *Detection of chitinase activity and its characterization from Pseudomonas fluorescens of tea rhizosphere*. Journal of Plantation Crops, Vol 43(3): 236-239

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

**Suty L.,** (2010). *La lutte biologique: Vers de nouveaux équilibres écologiques Sciences en partage*. Editions Quae, Paris, 328 p.

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

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

**Trapero-Casas, A. and Jimenez-Diaz, R.M.,**(1985). *Fungal wilt and root rot disease of chickpea in southern Spain*. *Phytopathology*,76(5) : 873-883.tropicale. Fondation Prota, Wageningen, Pays-Bas. P:102

**Trivedi, P. Pand, A.** (2008). *In vitro evaluation of antagonistic properties of Pseudomonas corrugata*. *Microbiological Research* (163): 329- 336

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

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

**Van Loon, L.C.,** (2007). *Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 119: 243-254.

**Verma,M., Satinder,K., Brar,R.D., Tyagi,R.Y., Surampalli,J., et Valero,R.,** (2007). *Antagonistic fungi, Trichoderma spp :Panoply of Biological control*. *Biochem. Eng.J.* 37:1-20.Vincent, M.N.,Harrison, L.A., Brackin, J.M., Kovacevich, P.A., Mukerji, P., Weller, D.M.

**Vidhyasekaran, P., Sethuraman, K., Rajappan, K., Vasumathi, K.** 1997. Powder Formulations of *Pseudomonas fluorescens* to Control Pigeonpea Wilt. *Biological Control*, **8**, 166-171.

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

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

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

**Weller,D.M., Thomashow,L.S.(1993).** Microbial metabolites with biological activity against plant pathogens. In : *Pest management : Biologically based technologies* (Lundsden, Rd ., Vanghan,J.L,eds), Am Chem Soc, Washington, DC, 67-89.

**Weller DM, Howie WJ, Cook RJ .1988.** Relationship between in vitro inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* and suppression of take all wheat by fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*78, 1094-110.

**Whipps, J.M. (2001).** *Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere.* J. Exp. Bot. 52:487-511.

**Wollenweber H. W. et Reinking O. A., (1935),** *Die Fusarien.* Verlagsbuchhandlung Paul Parey, Berlin, In: Nelson P. E., Tousson T. A. et Marasas W. F., [1983], *Fusarium species. An illustrated manual for identification.* Penn. Stat. Univer. Press., 193 p.

**Zamora L.M., Carretero C. & Parés D., (2006).** *Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blood, following spray-drying and freeze-drying.* Food Sci. Technol. Int., 12, 77-84.

**Zahir Z.A., Arshad M. and Frankenberger W.T., Jr. (2004).** *Plant promoting rhizobacteria : perspectives and application in agriculture.* Advances in Agronomy, 81, pp 96-168

**Zayed, G. and Ross Y.H. (2004).** Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. Process biochemistry 39, 1081-1086.

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

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

## الحويية والنشاط العدائي لـ *Pseudomonas spp. fluorescent* المجففة بالتجميد مقابل *Fusariose vasculaire*.

### ملخص

يهدف عملنا إلى تحديد تأثير التجفيف والحماية من التجميد على حيوية ونشاط *Pseudomonas spp fluorescent*، عامل المكافحة البيولوجية لـ *Fusariose vasculaire* أثناء التخزين. يدرس الجزء الأول من عملنا حيوية أربعة سلالات من *Pseudomonas spp fluorescent* المجففة مع وبدون واقى ( F21 ، BB10 ، BB9 ، و PI9) بعد 5 سنوات من التخزين عند 4 درجة مئوية عن طريق العد المباشر على طبق بتري. تظهر نتائج العد على طبق البتري أن سلالات *Pseudomonas spp. fluorescent* تناقصت حيويتها بعد 5 سنوات من التجفيف. يتراوح معدل البقاء على قيد الحياة بين 2.84% و 32.27% على التوالي من سلالات BB10 و PI9 المجففة بالتجميد مع الواقى وبين 4.27% و 25.21% على التوالي مع سلالات BB9 و F21 المجففة بدون واقى.

يتناول الجزء الثاني دراسة فعالية السلالات الأربعة من من *Pseudomonas spp fluorescent* المجففة بالتجميد بالمقارنة مع السلالات الغير مجففة بالتجميد ( F21 ، BB10 ، BB9 ، و PI9) بواسطة اختبار القدرة على إنتاج بعض المركبات الثانوية. أظهرت السلالات الأربعة من *Pseudomonas spp. fluorescent* التي خضعت للاختبار قدرة على إنتاج مركبات ثانوية تستعمل في التحفيز النباتي (Acide Indole Acétique, الفوسفور) و المكافحة البيولوجية (سيانيد الهيروجين, phenazine , الانزيمات منها الكيتيناز , البروتياز , الاميلاز )، و كان إنتاج سيانيد الهيروجين و الكيتيناز غائبا في جميع السلالات المجففة.

دراسة فعالية السلالات الأربعة من *Pseudomonas spp. fluorescent* لتبيط الممرض تم بواسطة تطبيق طريقة المواجهة المباشرة وجها لوجه مع السلالات الفطرية الثلاثة من *Fusarium oxysporum* : F.o.a , F.o.l , F.o.ln جعلت هذه الطريقة من الممكن تسليط الضوء على إمكانات العدائية في المختبر ، المتغيرة ضد السلالات الفطرية في اوساط النمو الثلاثة (KB، PDA والمختلط). تم الحصول على أفضل نتيجة من سلالة F21 مقابل FoIn مع معدل تثبيط من وسط 55.15% على وسط KB.

**الكلمات المفتاحية:** Rhizobacteria ، *Pseudomonas spp. fluorescent* ، *Fusarium oxysporum* ، التجفيف بالتجميد ، الحماية.

## Annexe 01

**Tableau 01:** Quelques exemples des souches de *Fusarium oxysporum* spp. Et de leurs plantes hôtes.

Souche	Plante hôte
<i>F. oxysporum f. sp. lycopersici</i>	Tomate
<i>F. oxysporum f. sp. radicis lycopersic</i>	Tomate
<i>F. oxysporum f. sp. cucumerinum</i>	Concombre
<i>F. oxysporum f. sp. betae</i>	Betterave
<i>F. oxysporum f. sp. lentis</i>	Lentille
<i>F. oxysporum f. sp. fabae</i>	Fève
<i>F. oxysporum f. sp. pisi</i>	Pois
<i>F. oxysporum f. sp. ciceri</i>	Pois chiche
<i>F. oxysporum f. sp. melonis</i>	Melon
<i>F. oxysporum f. sp. phaseoli</i>	Haricot
<i>F. oxysporum f. sp. cubense</i>	Banane
<i>F. oxysporum f. sp. coffeae</i>	Café
<i>F. oxysporum f. sp. asparagi</i>	Asperge
<i>F. oxysporum f. sp. canariensis</i>	Palmier des Canaries
<i>F. oxysporum f. sp. albedinis</i>	Palmier dattier
<i>F. oxysporum f. sp. raphani</i>	Radis
<i>F. oxysporum f. sp. cepae</i>	Oignon
<i>F. oxysporum f. sp. niveum</i>	Pastèque
<i>F. oxysporum f. sp. batatas</i>	Patate douce
<i>F. oxysporum f. sp. lini</i>	lin

(Hamini, 2010).



## Annexe 03

- **Préparation des milieux de culture**

Le milieu est stérilisé à l'autoclave pendant 20 minutes, à une température environ 120°C. Ces ingrédients pour 1 litre d'eau distillé. Il est ensuite placé à une température ambiante afin de le refroidir pour le manipuler plus facilement et surtout afin d'éviter la condensation sur les couvercles des boites de pétries.

<p><b>Milieu CAS</b></p> <p>Chrome Azorul S ..... 1.21g.</p> <p>Hexadecyltrimethyl ammonium bromide ..... 1.82g.</p> <p>Milieu King B ..... 42.23g.</p> <p>pH = 6.8.</p>	<p><b>TSA ( Tryptone-Soya-Agar)</b></p> <p>Peptone de caseine ..... 17g.</p> <p>Peptone de farine de soja .....3g.</p> <p>Glucose ..... 2.5g.</p> <p>Chlorure de Sodium ..... 5g.</p> <p>Phosphate dipotassique ..... 2.5.</p> <p>Glycine ..... 4.4g/l.</p>
<p><b>Milieu LB (Lauria Bertain)</b></p> <p>Bactotryptone..... 10g.</p> <p>Extrait de levure ..... 5g.</p> <p>Nacl ..... 5g.</p> <p>Agar ..... 5g.</p> <p>Tryptophane..... 5g.</p> <p>pH = 7.</p>	<p><b>NBY (Nutrient Broth Yeast extract)</b></p> <p>Bouillon nutritif ..... 8g.</p> <p>Extrait de levure ..... 2g.</p> <p>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 2g.</p> <p>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 0.5g.</p> <p>MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O ..... 0.25g.</p> <p>Glucose ..... 2g.</p> <p>Agar ..... 15g.</p>
<p><b>TSB (Tryptone-Soya-Bouillon)</b></p> <p>Tryptophane ..... 5g.</p> <p>Peptone..... 20g.</p> <p>Glucose ..... 2.5g.</p> <p>Nacl ..... 5g.</p> <p>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 4.5g.</p>	<p><b>Lait écrémé</b></p> <p>Caséine ..... 5g.</p> <p>Extrait de levure ..... 2.5g.</p> <p>Glucose ..... 1g.</p> <p>Solution de 7% de lait écrémé..... 100ml.</p> <p>pH = 7.5.</p>

<p><b>Milieu de Pikovskaya</b></p> <p>Glucose ..... 10g.  Phosphate bicalcique ..... 5g.  Extrait de levure ..... 0.5g.  (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ..... 0.5g.  MgSO<sub>4</sub>,7H<sub>2</sub>O ..... 0.1g.  Agar ..... 17g.  MnSO<sub>4</sub> ..... Trace.  FeSO<sub>4</sub> ..... Trace.  KCL ..... 0.2g.  Bleu bromophénol ..... 4ml.  pH = 6.7.</p>	<p><b>Gélose à la chitine</b></p> <p>Extrait de viande ..... 1g.  Extrait de levure ..... 2.5g.  Peptone ..... 5g.  Chlorure de sodium ..... 5g.  Chitine ..... 2g.  Agar ..... 15g.  pH = 7.</p>
<p><b>Gélose nutritive additionné d'amidon</b></p> <p>Extrait de viande ..... 1g.  Extrait de levure ..... 2.5g.  Peptone ..... 5g.  Chlorure de sodium ..... 5g.  Amidon ..... 2g.  Agar ..... 15g.  pH = 7.</p>	<p><b>King B : (King et al., 1954)</b></p> <p>Peptone..... 20g.  Agar..... 20g.  K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 1.5g.  MgSo<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O..... 1.5g.  Glycérol..... 15ml.  pH = 7.2.</p>
<p><b>Milieu PDA (Potato- Dextrose- Agar)</b></p> <p>Pomme de terre..... 250g.  Dextrose..... 20g.  Agar..... 20g.  pH = 5.6.</p>	<p><b>Milieu mixte (50% PDA + 50% KB)</b></p> <p>Pomme de terre..... 125g.  Dextrose..... 10g.  Peptone..... 10g.  Agar..... 10g.  K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 0.75g.  MgSo<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O.....0.75g.  Glycérol.....7.5ml.</p>

## Annexe 04

**Tableau 03:** L'indice de solubilisation de phosphatase par les souches non lyophilisées.

Souche	Diamètre de l'halo (cm)	Diamètre de la colonie (cm)	IS%
F21	3.1	1.9	63.1
BB10	3	2.2	36.3
BB9	2.5	2.1	19.04
PI9	3.4	2.3	47.82

**Tableau 04 :** L'indice de solubilisation de phosphatase par les souches lyophilisées

Souche	Diamètre de l'halo (cm)	Diamètre de la colonie (cm)	IS%
F21	2.6	1.7	52.94
BB10	2.8	2.2	27.27
BB9	2.1	1.8	16.66
PI9	2.4	1.9	26.31

**Tableau 05 :** L'indice de solubilisation de Protéase par les souches non lyophilisées

Souche	Diamètre de l'halo (cm)	Diamètre de la colonie (cm)	IS%
F21	4	3.3	21.21
BB9	4.4	3	36.84
BB10	2.6	1.9	84.21
PI9	3.1	2.0	55

**Tableau 06 :** Les résultats de production des enzymes protéolytiques par les souches lyophilisées.

Souche	Ø de halo (cm)	Diamètre de la colonie (cm)	IS%
F21	3.1	2.8	10.71
BB9	3.7	3.1	19.35
BB10	3.5	1.9	46.66
PI9	2.8	2.2	27.2

## Annexe 05

**Tableau 07** : Résultat de confrontation des souches de *Pseudomonas spp.* fluorescent non lyophilisées vis-à-vis les trois souches de *Fusarium oxysporum*.

NL			Foa			Fol			Foln		
F2 1	KB	Moyenne									
		De pathogène (cm)	3.7	4	3.9	3.7	3.5	3.8	3.5	4	3.8
		Ecart type	0.15			0.15			0.25		
		PI(%)	30.18	24.52	26.41	47.14	50	45.71	58.33	52.38	54.76
	PDA	Moyenne									
		De pathogène (cm)	3.5	5.7	3.8	5.3	5.1	4.9	5.5	4.2	4.9
		Ecart type	1.19			0.2			0.65		
		PI(%)	38.59	0	33.33	32.05	34.61	37.17	34.52	50	41.66
	MIX	Moyenne									
De pathogène (cm)		5.2	4.7	4.7	4.8	3.9	5	3.3	3.7	4.5	
Ecart type		0.28			0.58			0.61			
	PI(%)	20	27.69	27.69	36.84	48.68	34.21	58.75	53.75	43.75	
BB 10	KB	Moyenne									
		De pathogène (cm)	5.3	2.6	3.1	4	5.1	4.2	3.5	3.7	4.4
		Ecart type	1.43			0.58			0.47		
		PI(%)	0	50.94	41.50	42.85	27.14	40	58.33	55.95	47.61
	PDA	Moyenne									
		De pathogène (cm)	3.5	3.9	3.7	4.4	4.8	6	3.1	3.6	5.5

		Ecart type	0.2			0.83			1.12		
		PI(%)	38.59	31.57	35.08	43.58	38.46	23.07	63.09	57.14	34.52
	MIX	Moyenne									
		De pathogène (cm)	4.7	5.1	4.9	6.2	6.3	6.8	4	6.2	6
		Ecart type	0.2			0.32			1.21		
PI(%)	27.69	21.53	24.61	18.42	17.10	10.52	50	22.5	28.57		
BB 9	KB	Moyenne									
		De pathogène (cm)	4.8	4.6	4.5	3.2	4.5	4.3	4.3	4	4.5
		Ecart type	0.15			0.52			0.25		
	PI(%)	9.43	13.2	15.09	54.28	35.71	38.57	48.8	52.38	46.42	
	PDA	Moyenne									
		De pathogène (cm)	3.6	2.9	3	4.4	5.9	7.8	5	5	5.1
		Ecart type	0.37			1.7			0.05		
	PI(%)	36.48	49.12	47.36	43.58	24.35	0	40.47	40.47	39.28	
	MIX	Moyenne									
		De pathogène (cm)	5.5	5	6.5	6.8	6.1	6.1	5.2	4	3.8
Ecart type		0.76			0.4			0.75			
PI(%)	15.38	23.07	0	10.52	19.73	19.73	35	50	52.5		
PI9	KB	Moyenne									
		De pathogène (cm)	4.3	4	3.9	4.6	4	4.5	4.2	4.2	4.1
	Ecart type	1.02			1.27			0.32			
PI(%)	18.86	24.52	26.41	34.28	42.85	35.71	50	50	51.19		

	PDA	Moyenne De pathogène (cm)	2.5	4.4	4.1	4.8	6.5	4	6.5	6	5.9
		Ecart type	1.02			1.27			0.32		
		PI(%)	56.14	22.8	28.07	38.46	16.66	48.71	22.61	28.57	29.76
	MIX	Moyenne De pathogène (cm)	4.5	4	4	4.1	4.2	4.5	4.2	4.3	4
		Ecart type	0.28			0.2			0.15		
		PI(%)	30.76	38.46	48.36	46.05	44.73	40.78	47.5	46.25	50

**Tableau 08:** Résultat de confrontation des souches de *Pseudomonas spp.* fluorescent lyophilisées vis-à-vis les trois souches de *Fusarium oxysporum*.

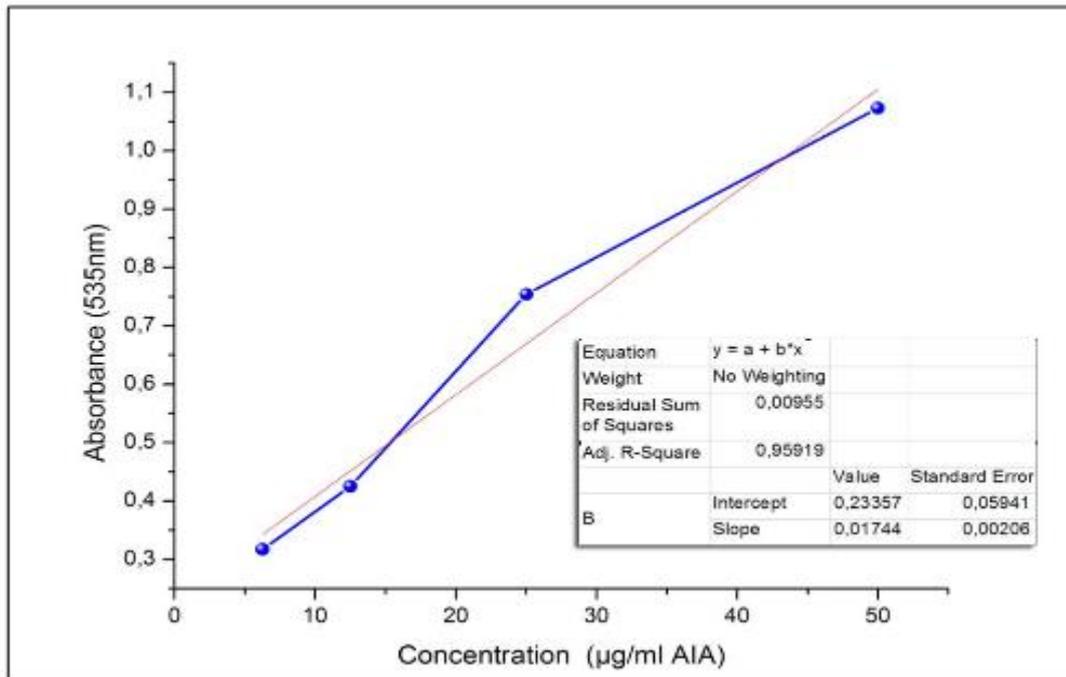
L			Foa			Fol			Foln		
F2 1	KB	Moyenne De pathogène (cm)	4.5	4.9	4.2	4.3	4.4	5.5	4.3	4.5	4.5
		Ecart type	0.35			0.65			0.11		
		PI(%)	15.09	7.54	20.75	38.57	37.14	21.42	48.8	46.42	46.42
	PDA	Moyenne De pathogène (cm)	4	4.1	4.2	5	5.4	5.5	5.9	4.3	4.3
		Ecart type	0.1			0.26			0.92		
		PI(%)	29.82	28.07	26.31	35.89	30.76	29.48	29.76	48.8	48.8
	MIX	Moyenne De pathogène (cm)	5.1	5.5	5.2	4.9	5.4	4.7	4.8	5.9	5.1
		Ecart type	0.2			0.36			0.56		
		PI(%)	21.53	15.38	20	35.52	28.94	38.15	40	26.25	36.25

BB 10	KB	Moyenne De pathogène (cm)	2.3	4.7	2.8	4.5	3.8	4.5	3.8	4.8	6.9
		Ecart type	1.26			0.4			1.58		
		PI(%)	56.6	11.32	47.16	35.71	45.71	35.71	54.76	42.85	17.85
	PDA	Moyenne De pathogène (cm)	4	3.1	4.2	6.1	6	6.6	3.6	4.9	4.3
		Ecart type	0.58			0.32			0.65		
		PI(%)	29.82	45.61	26.31	21.79	23.07	15.38	57.14	41.67	48.80
	MIX	Moyenne De pathogène (cm)	5.6	5.5	5.7	5.5	6.2	6	7.2	5	6.5
		Ecart type	0.1			0.36			1.12		
		PI(%)	13.84	15.38	12.3	27.63	18.42	21.05	10	37.5	18.75
BB 9	KB	Moyenne De pathogène (cm)	4.4	5.9	4.7	5	3.5	3.7	4.8	4.7	4.7
		Ecart type	0.79			0.81			0.05		
		PI(%)	16.98	0	11.32	28.57	50	47.14	42.85	44.04	44.04
	PDA	Moyenne De pathogène (cm)	3.1	3.3	4.1	6.4	7.5	7.1	4.3	6.8	5.9
		Ecart type	0.52			0.55			1.26		
		PI(%)	45.61	42.1	28.07	17.94	3.84	8.97	48.8	19.04	29.76
	MIX	Moyenne De pathogène (cm)	5.8	6	5.5	6	6.9	6	5.8	5.6	4.8
		Ecart type	0.25			0.51			0.52		
		PI(%)	10.76	7.96	15.38	21.05	9.21	21.05	27.5	30	40
PI9	KB	Moyenne De pathogène (cm)	5.9	4.8	4.8	6.3	7	6.4	5.3	5.1	5.5
		Ecart type	0.63			0.37			0.2		
		PI(%)	0	9.4	9.4	10	0	8.57	36.9	39.28	34.52

	PDA	Moyenne De pathogène (cm)	3.5	3.1	4.3	4.5	6.6	6.6	5.8	6.4	6.5
		Ecart type	0.61			1.21			0.37		
		PI(%)	38.59	45.61	24.56	42.3	15.38	15.38	30.95	23.8	22.61
	MIX	Moyenne De pathogène (cm)	5.1	5	5	6.8	6.2	6	6	4.5	4.5
		Ecart type	0.05			0.41			0.86		
		PI(%)	21.53	23.07	23.07	10.52	18.42	21.05	25	43.75	43.75

## Annexe 06

### 1-Détermination graphique de la courbe d'AIA (Mezaache, 2012)



# Chapitre III

## Résultats et discussions

# Conclusion

# références bibliographiques

# **Annexes**