

Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens*

Publication 1- *Biotechnol. Agro. Soc. Environ.*

Biotechnology, Agronomy, Society and Environment

Mputu Kanyinda Jean-Noël^(1,2), Pierart Céline⁽³⁾, Destain Jacqueline⁽¹⁾, Noki Philippe⁽²⁾,
Thonart Philippe⁽¹⁾

⁽¹⁾ Université de Liège-Gembloux Agro-Bio Tech, Dpt. de Chimie et Bio-industrie. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique). E-mail : kanyinda2004@gmail.com.

⁽²⁾ Université de Kinshasa, Faculté des Sciences, Dpt. de Chimie. Mont-Amba, B.P. 190 KinXI. Kinshasa (R.D.Congo).

⁽³⁾ Artechno SA, rue Camille Hubert, 17-Crealy Science Park, 5032 Isnes/ Gembloux, Belgique.

Remerciements

Nous remercions très sincèrement la Coopération Technique Belge et la Wallonie Bruxelles pour leur soutien financier.

* Corresponding author: Centre Wallon de Biologie Industrielle, Passage des déportés n°2
Tel.+32.81.62.23.05, Fax.+32.81.61.42.22, E-mail:kanyinda2004@gmail.com.

Résumé

Le séchage de *Pseudomonas fluorescens* rend plus économique sa conservation, son transport et sa commercialisation. Il a pour but d'arrêter et de stabiliser toute activité biologique en vue d'une conservation optimale, compatible avec la préservation d'une viabilité maximale. La viabilité des bactéries après séchage dépend des conditions opératoires de ce dernier. L'un des critères les plus importants à considérer lors du séchage de produits biologiquement actifs est la qualité du produit final sec. La lyophilisation est la méthode de séchage la plus utilisée pour *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. L'utilisation de composés protecteurs avant la lyophilisation permet de réduire les phénomènes d'oxydation tout en maintenant une viabilité élevée au cours du stockage.

Mots-clés. Acide gras, Composé protecteur, lyophilisation, oxydation, *Pseudomonas*, viabilité.

Abstract

The drying *Pseudomonas fluorescens* makes more economical storage, transportation and marketing. It aims to stop and to stabilize all biological activities for an optimal storage, compatible with the conservation of maximum viability of microorganisms desired. The viability of bacteria after drying depends on the operating conditions of the latter. One of the most important criteria to consider during the drying of biologically active products is the quality of the final dried product. Freeze-drying is the most drying method used for *Pseudomonas*. But temperature changes it induced are not without consequence for the cells. They are responsible for cell damage (peroxidation of fatty acids) and genetic (proteins and DNA oxidation). However, use of protective compounds during freeze-drying and during storage increases significantly the rate of cell viability.

Chapitre 1. Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens*

Keys words: Fatty acids, Freeze-drying, oxidation, protective compounds, *Pseudomonas*, viability.

1. *Pseudomonas fluorescens*

1.1 Introduction

Pseudomonas fluorescens est une bactérie gram-négative, fermentant le glucose mais pas le lactose, oxydase positive en forme de bâtonnets avec des flagelles polaires qui lui assurent la mobilité. C'est une bactérie ubiquitaire rencontrée dans les sols, sur les racines des végétaux, sur les plantes, ainsi que dans les eaux douces et marines (Charan, Reddy et al. 2011; Wong, Levi et al. 2011). Il appartient à la classe des *Gammaproteobacteria*, famille des *Pseudomonadacea* et au genre *Pseudomonas*. La fluorescence est due à la production d'un pigment fluorescent jaune-vert appelé pyoverdine soluble dans l'eau et insoluble dans le chloroforme (Paulsen, Press et al. 2005; Wong, Levi et al. 2011; Gao, Yin et al. 2012; Trögl, Chauhan et al. 2012). Sa température de croissance optimale se situe entre 25 et 30°C.

1.2. Ecologie

Pseudomonas fluorescens est une espèce commensale chez les plantes, leur permettant d'atteindre les éléments nutritifs indispensables à leur croissance. Il dégrade les polluants et produit des antibiotiques. Cette espèce est connue pour son aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires des plantes, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes (Akram *et al.*, 2008; Aremu *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2012). Cette inhibition résulte de plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes et de sidérophores. Ces derniers ont une grande affinité pour le fer et engendrent donc une compétition avec d'autres organismes du sol (Dhanya and Potty, 2007; Bhattacharya, 2010). On note également pour certaines souches une capacité à induire les mécanismes de défense chez la plante, mais dans la plupart des cas d'inhibition, le facteur

Chapitre 1. Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens*

déterminant est la production d'antibiotiques agissant directement sur l'agent pathogène (Walsh *et al.*, 2001; Charde and Dawande, 2010).

1.3. Métabolisme

Pseudomonas fluorescens a des besoins nutritionnels simples et peut facilement se développer dans des milieux minéraux complétés par une variété de sources de carbone, certaines souches peuvent utiliser l'ion nitrate (NO_3^-) comme accepteur d'électrons en lieu et place de l' O_2 . Il produit de la pyoverdine, responsable de la chélation de fer (Bhattacharya, 2010). Il produit également certaines enzymes stables à la chaleur (lipases et protéases) qui sont impliquées dans l'altération du lait (Bakker *et al.*, 2007; Charde and Dawande, 2010) ; mais aussi certains antibiotiques (2,4-diacetylphloroglucinol, phenazines, pyrrolnitrine, HCN etc...) qui contribuent à la protection contre les pathogènes (Walsh *et al.*, 2001; Paulsen *et al.*, 2005; Anand and Kulothungan, 2010).

1.4. Caractéristique de la structure membranaire de la bactérie gram négative

Structure membranaire

La paroi cellulaire des bactéries Gram-négatives est fine et élastique; elle est couverte d'une membrane externe contenant les lipides liés de manière covalente à des polysaccharides tandis que celle des bactéries Gram-positives est épaisse et rigide (Coulibaly *et al.*, 2008; Coulibaly, 2010; Volodymyr, 2010). Les bactéries gram-négatives ont une couche de peptidoglycane d'environ 5 à 10 nm d'épaisseur entre les membranes plasmiques intérieure et extérieure, tandis que l'épaisseur de cette couche est d'environ 20 à 80 nm chez les bactéries Gram-positives (**Figure 1**) (Beveridge, 1999; Tripathi *et al.*, 2012). Les parois cellulaires des bactéries Gram-négatives, avec une couche plus mince de peptidoglycane que celles de bactéries Gram-positives, ont tendance à se rompre plus facilement pendant les processus de dessiccation et de réhydratation (Pembrey *et al.*, 1999).

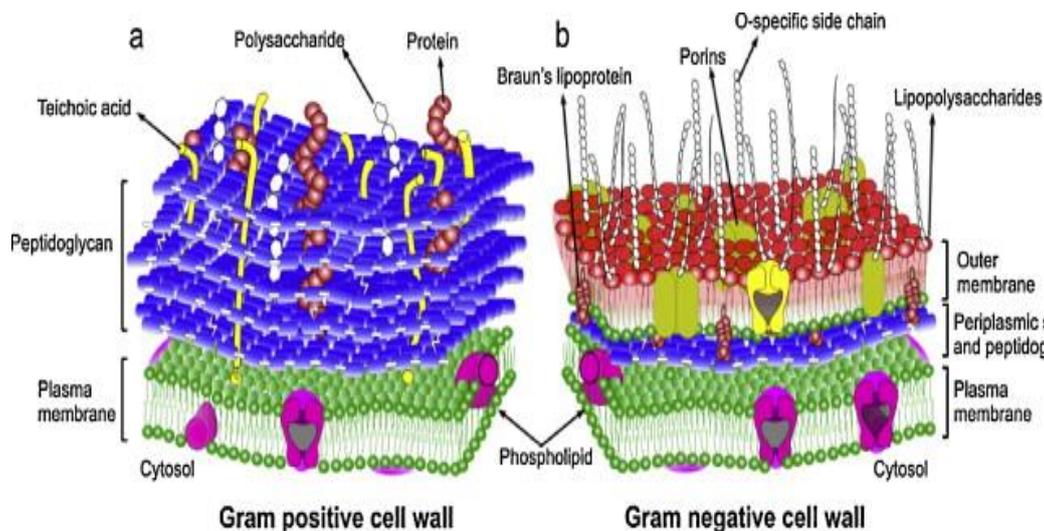


Figure 1. Différence entre la paroi d'une bactérie gram-négative et gram-positve d'après Tripathi *et al.* (2012).

L'absence d'acide teichoïque chez les bactéries Gram-négatives réduit encore leur résistance au séchage par rapport aux bactéries Gram-positives. Enfin la plupart des bactéries Gram-négatives ont des lipopolysaccharides sur leur surface, ces lipopolysaccharides peuvent piéger des molécules d'eau, entraînant une baisse des taux de survie au cours du stockage à long terme (Miyamoto-Shinohara *et al.*, 2008; Miyamoto-Shinohara *et al.*, 2010).

1.5. Applications de *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens a plusieurs applications, les plus connues concernent l'agriculture où il est utilisé en lutte biologique et comme stimulateur de croissance des plantes PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) (Ongena *et al.*, 2000; Ongena *et al.*, 2005; Russo *et al.*, 2005; Couillerot *et al.*, 2009; Anita and Samiyappan, 2012; Gao *et al.*, 2012). *Pseudomonas fluorescens* combat plusieurs infections des plantes, leurs modes d'action dans la suppression des maladies des plantes incluent les sidérophores pour la compétition du fer disponible, l'antibiose, la production d'enzymes lytiques et le Système de Résistance Induit (ISR) (Ongena *et al.*, 1999; Ongena *et al.*, 2005; Paulsen *et al.*, 2005; Russo *et al.*, 2005; Bakker *et al.*, 2007; Anita and Samiyappan, 2012). Il est également utilisé comme catalyseur dans la réaction de transestérification de l'huile de *Jatropha* pour la production de biodiesel

Chapitre 1. Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens*

(Devanesan *et al.*, 2007). *Pseudomonas fluorescens* joue aussi un rôle dans la protection de l'environnement par la dégradation des hydrocarbures et d'autres types de polluants (Lemire *et al.*, 2010; Pandey and Upadhyay, 2010; Moneke *et al.*, 2010). *Pseudomonas fluorescens* est actuellement étudié en médecine car il 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-Hautier, 2006).

2. Généralités sur le séchage des micro-organismes

2.1. Introduction

Les souches microbiennes, qu'ils s'agissent de bactéries, de levures ou de moisissures, nécessitent un conditionnement stable durant une longue période en vue de leur commercialisation (Zamora *et al.*, 2006). Les cellules microbiennes se conservent rarement à l'état natif dans leur milieu de culture. Leur croissance est souvent réalisée en fermenteur dans un substrat liquide mais conservés 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 and Zhang, 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. (Bossart and Halloin, 2001; Demirhan and Özbek, 2010). Il existe plusieurs techniques de séchage des microorganismes appliquées à l'échelle industrielle à savoir l'atomisation (Bucio *et al.*, 2005; Coulibaly *et al.*, 2011), la fluidisation (Li *et al.*, 2004) et la lyophilisation (Rey, 1965; Perry,

Chapitre 1. Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens*

1998; Palmfeldt *et al.*, 2003; Zhao and Zhang, 2005; Nanasombat and Sriwong, 2007; Coulibaly *et al.*, 2009). Ces méthodes sont assez agressives vis-à-vis des micro-organismes puisqu'elles soumettent ces derniers à des variations plus ou moins importantes de température et ou de pression. Par ailleurs, des effets liés au flux d'eau à travers les membranes cellulaires peuvent également être déterminants sur la qualité du produit séché (Bossart and Halloin, 2001; Coulibaly *et al.*, 2011). Ces techniques entraînent des dommages à la membrane cellulaire, comme une peroxydation lipidique, une dénaturation des protéines et de l'ADN conduisant *in fine* à une perte de viabilité (Zhao and Zhang, 2005). De toutes ces techniques, la littérature indique que la lyophilisation apparaît la plus utilisée en dépit de son coût, 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 and Pelczar, 1963; Vidhyasekaran and Muthamilan, 1995; Palmfeldt *et al.*, 2003).

2.2. Impact du séchage sur la viabilité des bactéries

Le séchage a un impact direct sur la viabilité des bactéries. Il existe plusieurs facteurs qui influencent directement cette viabilité, il s'agit notamment des facteurs physiques (Lievens and Riet van't, 1994; Morgan *et al.*, 2006; Coulibaly *et al.*, 2011) mais aussi des facteurs biologiques (Lievens and Riet van't, 1993; Miyamoto-Shinohara *et al.*, 2008). Les bactéries gram-positives résistent mieux à la lyophilisation comme les bactéries lactiques (Castro *et al.*, 1995; Perry, 1998; Selmer-Olsen *et al.*, 1999; Nanasombat and Sriwong, 2007) tandis que leurs homologues gram-négatives, et 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-positives et gram-négatives est principalement due à la composition de leur paroi cellulaire. Il a été établi que la température, l'exposition à la lumière et l'humidité relative affectent la stabilité des bactéries lyophilisées au cours de leur stockage et favorisent

Chapitre 1. Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens*

les phénomènes d'oxydation (Teixeira *et al.*, 1996; Coulibaly *et al.*, 2010). D'autres aspects affectant la survie des bactéries pendant le séchage sont notamment l'acidité, la concentration de la biomasse et les réactions d'oxydation (Lieveuse and Riet van't, 1994). Une forte concentration d'acide est nuisible à la cellule tandis que la concentration élevée d'autres composants par exemple les sels dans le milieu provoque une augmentation de la pression osmotique pouvant conduire à la plasmolyse de la cellule (Lieveuse and Riet van't, 1994). 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 des stress et améliorer leur viabilité après le séchage tandis que (Jørgensen *et al.*, 1994) ont confirmé qu'il était essentiel pour la survie de *Pseudomonas fluorescens* que son activité d'eau soit comprise entre 0,2 et 0,4.

2.3. Les dégâts oxydatifs cellulaires

Le séchage et la conservation rendent les bactéries vulnérables aux phénomènes d'oxydation et sont responsables de différentes formes de dommages cellulaires. La lyophilisation entraîne des dommages à la membrane cytoplasmique, une modification de la composition des lipides, une altération de l'ADN/ARN et une dénaturation des protéines (Lieveuse and Riet van't, 1994; Santivarangkna *et al.*, 2008). Tous ces changements conduisent à la perte de la viabilité (Palmfeldt *et al.*, 2003; Nanasombat and Sriwong, 2007). L'oxydation des lipides membranaires est l'une des principales causes de la mortalité cellulaire durant le stockage (Halliwell and Chirico, 1993; Lieveuse and Riet van't, 1994). Castro *et al.* (1995 et 1996) et Coulibaly *et al.*, (2009) ont démontré que les dommages subits par la membrane cellulaire de *Lactobacillus* durant son stockage étaient en partie dus à la présence de l'humidité relative et à une température de stockage élevée. Jusqu'à ce jour peu d'études ont été menées sur la compréhension des mécanismes responsables de la perte de viabilité chez les bactéries Gram-négatives. Israeli *et al.*, (1993) ont montré que l'exposition à

Chapitre 1. Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens*

l'air et à la lumière augmentaient le taux de mortalité d'*Escherichia coli* et de *Pseudomonas syringae*. Palmefeldt *et al.* (2003) ont émis l'hypothèse selon laquelle la perte de viabilité des bactéries était en partie due à l'oxydation du DNA.

2.4. 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 (Lieveense and Riet van't, 1994). Le dommage subit par la membrane cytoplasmique est principalement du à la déshydratation, ce qui entraîne comme conséquence le relargage en solution des composants intracellulaires (cations, nucléotides, enzymes, protéines etc) des cellules lyophilisées au cours de leur réhydratation (Lieveense and Riet van't, 1994; Yao *et al.*, 2008). Les températures élevées modifient les propriétés des molécules hydrophobes (acides gras) de la membrane et les interactions solvant-protéines au cours du séchage. Cela se traduit entre autres par une diminution de la stabilité des interactions hydrophobes entre deux molécules apolaires (acides aminés) au sein des membranes, par une modification de la configuration des protéines membranaires pouvant entraîner leur dénaturation (Mazur, 1970), et par la modification de la composition lipidique de la membrane au cours du stockage (Coulibaly *et al.*, 2010; Coulibaly *et al.*, 2011). Cette situation de stress pousse les cellules à utiliser leurs propriétés d'auto-défense contre ces phénomènes d'oxydation (production du glutathion, de la superoxyde dismutate etc.) (Leslie *et al.*, 1995; Luqman and Rizvi, 2006). Le glutathion est un tripeptide utilisé comme marqueur du degré de stress environnemental. Il protège les cellules contre les sous-produits générés par le métabolisme oxydatif en maintenant l'intégrité cellulaire et participe aux principaux processus cellulaires tels que la synthèse des protéines, la régulation de l'activité enzymatique, la synthèse du DNA. Tandis que la superoxyde dismutase détruit les radicaux

toxiques aux systèmes biologiques (Leslie *et al.*, 1995 ; Hultberg, 1998 ; Luqman and Rizvi, 2006).

2.4.1. Peroxydation lipidique

Pendant la lyophilisation et au cours du stockage, les bactéries subissent d'intenses phénomènes de dégradation, liés pour la plupart à l'oxydation des lipides membranaires. Ces réactions d'oxydation sont les principaux facteurs déterminant la durée de vie des cellules (Coulibaly *et al.*, 2011). La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit en présence d'oxygène. Tous les lipides contenant des acides gras insaturés sont concernés. Coulibaly *et al.* (2008) ; Yao *et al.* (2008) ont montré chez les bactéries gram-positives que les acides gras polyinsaturés étaient les premières cibles des attaques des radicaux libres au cours de leur stockage à l'état sec et génèrent des peroxydes lipidiques qui sont très réactifs. Ils ont également établi une relation entre la perte de la viabilité et la diminution du ratio acides gras polyinsaturés/ acides gras saturés (U/S) de cellules de *Lactobacillus* lyophilisées. Zhang *et al.* (2007) ont montré que les acides gras polyinsaturés avec au moins deux double liaisons étaient plus facilement oxydés. Cette peroxydation lipidique fournit une grande variété de produits, dont certains réagissent avec les protéines et l'ADN. Parmi ceux-ci citons : le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) qui sont les plus étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (Marnet, 1999; Yao *et al.*, 2009). Les mécanismes en chaîne de la dégradation des acides gras membranaires conduisent à la formation d'hydroperoxydes instables (ROOH) responsables de la diminution de la fluidité membranaire, de la dénaturation des protéines et du DNA, de la diminution de la perméabilité et de la sensibilité des membranes (Alberts *et al.*, 2012).

2.4.2. L'oxydation des protéines

Comme pour les lipides, la lyophilisation et le stockage entraîne des dommages aux protéines, étant donné que leur structure dépend partiellement de l'eau. Ces protéines forment avec l'eau des liaisons qui sont rompues lors de la lyophilisation conduisant ainsi à leur dénaturation. Les composés carbonyles réactifs tels que le ribose, le diacétyl et le pyruvate, doivent être enlevés de la suspension cellulaire avant la lyophilisation parce qu'ils peuvent réagir avec les groupes aminés des composants cellulaires essentiels et rendre ainsi les protéines vulnérables aux phénomènes d'oxydations (Lieveuse and Riet van't, 1994). Les réactions d'oxydations des protéines modifient les résidus d'acides aminés (lysine, arginine, proline et histidine) et génèrent des fragments carbonyles identifiés comme marqueur de l'oxydation des protéines (Luqman and Rizvi, 2006; Suzuki *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2011; Jha and Rizvi, 2011) (**figure 2**).

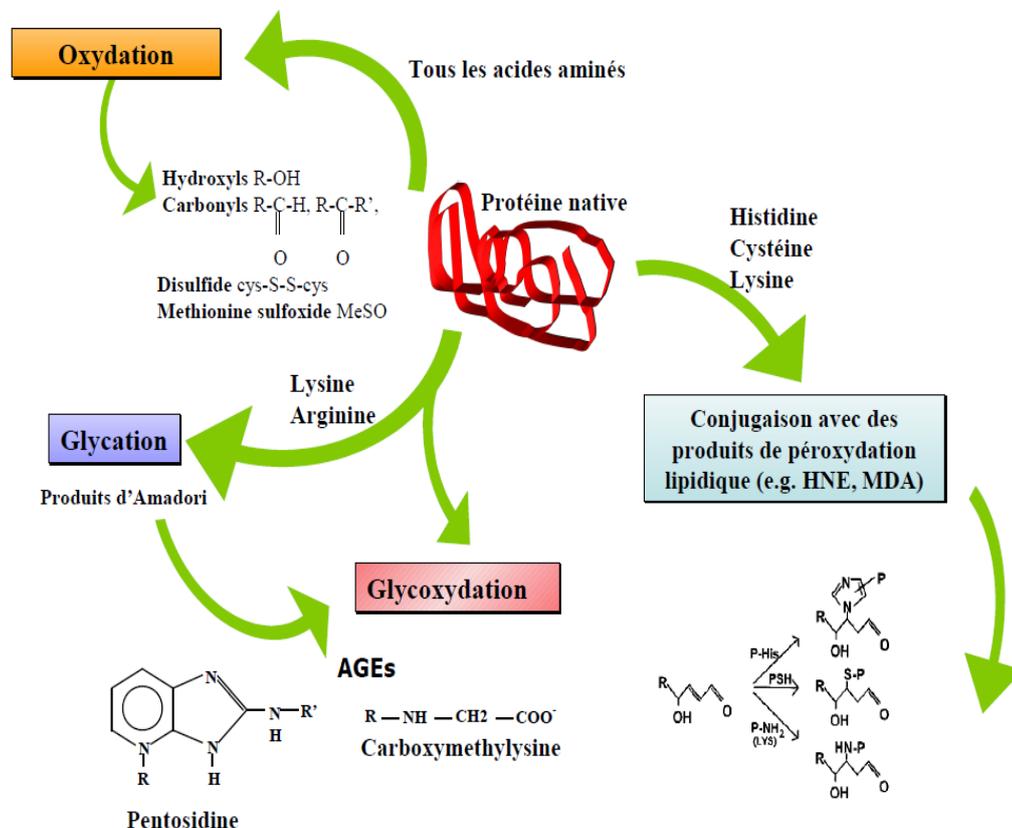


Figure 2. Le mécanisme de la modification oxydative des protéines (d'après Petropoulos 2011).

Chapitre 1. Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens*

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un ou plusieurs groupements sulfhydryles (SH). Leslie et al. (1995) ont montré que les protéines modifiées par oxydation s'insolubilisent et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases.

2.4.3. Dommage de l'ADN

Bien que le dégât subit par la membrane cellulaire pendant la lyophilisation joue 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 du DNA sont très nombreuses, il s'agit entre autre 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. En effet, la guanine est la cible privilégiée de nombreux oxydants (Cadet *et al.*, 1995; Cadet *et al.*, 2003; Saumaa *et al.*, 2007; Kumari *et al.*, 2008).

3. La cryoprotection des bactéries

La lyophilisation a longtemps été considérée comme la technique de déshydratation appropriée pour les bactéries (Palmfeldt, Radström et al. 2003; Morgan, Herman et al. 2006; Santivarangkna, Higl et al. 2008). Le choix d'un composé protecteur appropriés est très important pour assurer une viabilité élevée des bactéries pendant la lyophilisation et au cours du stockage (Lieveense and Riet van't 1993; Leslie, Israeli et al. 1995; Kawahara 2008).

Tableau 1. Quelques caractéristiques et substances utilisées comme cryoprotecteurs intracellulaires (CPI) et extracellulaires (CPE) d'après Coulibaly *et al.* (2011).

Chapitre 1. Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens*

Caractéristiques	Intracellulaires (CPI)	Extracellulaires (CPE)
Poids moléculaire (g/mol)	<400	>10000
Activité à une concentration de l'ordre	de la mole (M)	de la millimole (mM)
Exemples de molécules utilisées	glycérol, méthanol, éthanol, dyméthylsulfoxyde polyéthylène oxyde (PEO-400)	lactose, saccharose, tréhalose polyvinyl pyrrolidone, dextran maltodextrine, amidon

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, Marin et al. 2008). Le

Tableau 1 nous donne les différentes classes des composés protecteurs.

Yao *et al.* (2008 et 2009) ; Coulibaly *et al.*, (2009 et 2010) ont prouvé pour les bactéries Gram-positives que plus l'activité d'eau est basse mieux est la conservation des poudres lyophilisées. Dans ce système, l'activité de l'eau influence les réactions d'oxydation des lipides, car l'eau permet la mobilisation favorise la formation des substances pro-oxydantes. En général, une activité d'eau (*aw*) comprise entre 0,2 et 0,3 correspond aux vitesses d'oxydation les plus faibles. Par contre, une *aw* comprise entre 0,6 et 0,8 correspond aux vitesses d'oxydation les plus grandes (Coulibaly et al., 2011). De nombreux auteurs dont Harrison and Pelczar, (1963) ; Daigle *et al.* (2002) ; 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 (**tableau 2**).

Tableau 2. Viabilité des *Pseudomonas* après les différentes opérations de séchage.

Souches	technique	[cfu/ml]	[cfu/g]	auteurs
		avant séchage	après séchage	
<i>Pseudomonas</i> sp	Lyophilisation	7,8x10 ⁹	1,3x10 ⁹ (a)	Harrison et Pelczar, 1963
<i>P. fluorescens</i>		1,0x10 ¹⁰	3,2x10 ⁷ (a)	
<i>P. chlororaphis</i>		4,4x10 ⁹	6,8x10 ⁷ (a)	
<i>P. chlororaphis</i>	Lyophilisation	3,5x10 ⁹	9,1x10 ⁸ (a) 3,5x10 ⁶ (b)	Palmfeldt et al., 2003
<i>P. fluorescens</i> BRG100	Fluidisation	3,1x10 ⁹	6,6x10 ⁶ (a)	Daigle et al., 2002

(a) Poudre avec composé protecteur, (b) poudre sans composé protecteur

4. Conclusions

La lyophilisation reste à ce jour la technique la mieux adaptée pour le séchage et la conservation de *Pseudomonas fluorescens*, car elle permet l'obtention d'une poudre ayant une viabilité assez élevée comparativement à celles obtenues par atomisation ou par fluidisation. Les conditions opératoires d'obtention et de conservation d'une poudre ayant une meilleure activité métabolique sont relativement bien connues chez les bactéries Gram-positives, mais pas chez les Gram-négatives. Cependant les mécanismes de leur altération restent obscurs à ce jour. La connaissance de certains paramètres responsables de la perte de viabilité de *Pseudomonas fluorescens* pendant leur lyophilisation et au cours de leur stockage permettra de résoudre le problème lié à leur conservation et aussi à leur transport. Dans le souci d'optimiser la conservation de la poudre lyophilisée de *Pseudomonas fluorescens*, certaines techniques et voies de recherches doivent être explorées. Nous retenons parmi elles, l'étude des modifications subies par les structures cellulaires au cours des traitements de séchage et de conservation (la composition en acides gras membranaires, l'oxydation des acides gras, l'oxydation des protéines et l'oxydation de l'ADN) ainsi que l'utilisation d'un emballage adéquat (imperméable à la lumière et à l'oxygène).

5. Remerciements

Nous remercions très sincèrement la Coopération Technique Belge (CTB) et Wallonie Bruxelles International (WBI) pour leur soutien financier.

6. Bibliographie

Akram, A., M. Ongena, F. Duby, J. Dommes and P. Thonart, 2008: Systemic resistance and lipooxygenase-related defence response induced in tomato by *Pseudomonas putida* strain BTP1. *BMC Plant Biol.* **8**, 1-12.

Chapitre 1. Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens*

- Alberts, B., D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, Julian Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter, 2012: L'essentiel de la biologie cellulaire. lavoisier, Paris France.
- Anand, R. and S. Kulothungan, 2010: Antifungal metabolites of *Pseudomonas Fluorescens* against Crown Rot Pathogen of Arachis Hypogaea. An. Biol. Res. **1**, 199-207.
- Anita, B. and R. Samiyappan, 2012: Induction of systemic resistance in rice by *Pseudomonas fluorescens* against rice root knot nematode Meloidogyne graminicola. J. Biopest. **5**, 53-59.
- Aremu, M. O., O. A. Olu-Arotiowa, S. K. Layokun and B. O. Solomon, 2010: Growth of *Pseudomonas fluorescens* on Cassava Starch hydrolysate for Polyhydroxybutyrate production. J. Appl. Sci. Environ. Manage. **14**, 61-66.
- Bakker, P. A. H. M., C. M. J. Pieterse and L. C. V. Loon, 2007: Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. Amer. Phytopat. Soc. **97**, 239-243.
- Béal, C., M. Marin, E. Fontaine, F. Fonseca and J. P. Obert, 2008: Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In: G. Corrieu and F.-M. Luquet eds. *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments*. pp. 661-785. Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- Beveridge, T. J., 1999: Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. J. Bacteriol. 4725-4733.
- Bhattacharya, A., 2010: Siderophore Mediated Metal Uptake By *Pseudomonas Fluorescens* and Its Comparison To Iron (III) Chelation. Cey. J. Sci. (Bio. Sci.) **39**, 147-155.
- Bossart, L. and V. Halloin, 2001: Séchage des levures en lit fluidisé *Congrès Francophone de Génie des Procédés de Nancy*. Lavoisier, Nancy, France.

Chapitre 1. Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens*

- Bucio, A., R. Hartemink, J. W. Schrama, J. Verreth and F. M. Rombouts, 2005: Survival of *Lactobacillus plantarum* 44a after spraying and drying in feed and during exposure to gastrointestinal tract fluids in vitro. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **51**, 221-227.
- Cadet, J., M. Berger, B. Morin, S. Raoul and J. R. Wagner, 1995: Oxydative damage to DNA. : . Deutsche Bibliothek Cataloging-in-Publication Data, Germany.
- Cadet, J., T. Douki, D. Gasparutto and J.-L. Ravanat, 2003: Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mut. Res.* **531**, 5-23.
- Castro, H. P., P. M. Teixeira and R. Kirby, 1995: Storage of Lyophilized Cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 172-176.
- Charan, A. R., V. P. Reddy, P. N. Reddy, S. S. Reddy and S. Sivaramakrishnan, 2011: Assessment of genetic diversity in *Pseudomonas fluorescens* using PCR-based methods. *Bioem. Biodiv. Bioav.* **5**, 10-16.
- Charde, A. and A. Y. Dawande, 2010: Purification and characterization of proteinaceous compound from *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 948). *Asiatic J. Biotech. Res.* **1**, 20-22.
- Couillerot, O., C. Prigent-Combaret, J. Caballero-Mellado and Y. Moëgne-Locco, 2009: *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Let. Appl. Microbiol.* **48**, 505-512.
- Coulibaly, I., 2010: Contribution à l'étude de la resistance au séchage des bactéries lactiques *Gembloux Agro-Bio Tech. pp.* 235. Université de Liège, Gembloux.

Chapitre 1. Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens*

- Coulibaly, I., D. R. Dauphin, J. Destain and P. Thonart, 2008: Characterization of lactic acid bacteria isolated from poultry farms in Senegal. *Afr. J. Biotechnol.* **7**, 2006-2012.
- Coulibaly, I., R. Dubois-Dauphin, S. Danthine, L. Majad, T. Mejoub, J. Destain, F. Béra, J.-P. Wathelet and P. Thonart, 2011: Techniques de séchage des starters lactiques et mécanismes affectant la viabilité cellulaire suite à la lyophilisation. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **15**, 287-299.
- Coulibaly, I., R. Dubois-Dauphin, J. Destain, M.-L. Fauconnier, G. Lognay and P. Thonart, 2010: The resistance to freeze-drying and to storage was determined as the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity. *Inter. J. Microbiol.*, 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. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **157**, 70-84.
- Demirhan, E. and B. Özbek, 2010: Drying kinetics and effective moisture diffusivity of purslane undergoing microwave heat treatment. *Korean J. Chem. Eng.* **27**, 1377-1383.
- Devanesan, M. G., T. Viruthagiri and N. Sugumar, 2007: Transesterification of *Jatropha* oil using immobilized *Pseudomonas fluorescens*. *Afr. J. Biotechnol.* **6**, 2497-2501.
- Dhanya, M. K. and V. P. Potty, 2007: Siderophore production by *Pseudomonas fluorescens* isolated from the rhizosphere of *Solenostemon rotundifolius*. *J. Root Crops* **33**, 138-140.
- Gao, G., D. Yin, Y. Chen, F. Xia, J. Yang, Q. Li and W. Wang, 2012: Effect of Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* 2P24 on Soil Fungal Community in Cucumber Rhizosphere Using T-RFLP and DGGE. *Soil Fungal Com. Cucum. Rhizos.* **7**, 1-9.

Chapitre 1. Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens*

- Halliwell, B. and S. Chirico, 1993: Lipid peroxydation: its mechanism, measurement and significance 1-3. *Amer. J Clin. Nutr.* **57**, 715S-725S.
- Harrison, A. P. and M. J. Pelczar, 1963: Damage and survival of bacteria during freeze-drying and during storage over a ten-year period. *J. Gen. Microbiol.* **30**, 395-400.
- Jha, R. and S. I. Rizvi, 2011: Carbonyl formation in erythrocyte membrane proteins during aging in humans. *Biomed. Pap.* **155**, 1-4.
- Jørgensen, F., O. Nybroe and S. Knøchel, 1994: Effect of starvation and osmotic stress on viability and heat resistance of *Pseudomonas fluorescens* AH9. *J. Appl. Microbiol.* **77**, 340-347.
- Kawahara, H., 2008: Cryoprotectants and Ice-Binding Proteins. In: R. Margesin, F. Schinner, J. C. Marx and C. Gerday eds. *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology*. pp. 229-243. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Kumari, S., R. P. Rastogi, K. L. Singh, S. P. Singh and R. P. Sinha, 2008: DNA Damage: Detec. Strat. *EXCLI J.* **7**, 44-62.
- Lemire, J., R. Mailloux, C. Auger, D. Whalen and V. D. Appanna, 2010: *Pseudomonas fluorescens* orchestrates a fine metabolic-balancing act to counter aluminium toxicity. *Environ. Microbiol.* **12**, 1384-1390.
- Leslie, S. B., E. Israeli, B. Lighthart, J. H. Crowe and L. M. Crowe, 1995: Trehalose and Sucrose Protect Both Membranes and Proteins in Intact Bacteria during Drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3592-3597.
- Li, J., Y. Pan, G. Chen, A. S. Mujumdar and M. Zhou, 2004: Fluidized-bed drying of biological materials: two cases studies *Inter.Drying Symp.* São Paulo, Brazil.

Chapitre 1. Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens*

Lievensse, L. C. and K. Riet van't, 1993: Convective Drying of Bacteria. The drying process. Adv. Biotechnol. Eng. Biotechnol. **50**, 45-63.

Lievensse, L. C. and K. Riet van't, 1994: Convective Drying of Bacteria. Factors influencing survival. Adv. Biotechnol. Eng. Biotechnol. **51**, 77-88.

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

Luqman, S. and S. I. Rizvi, 2006: Protection of lipid peroxidation and carbonyl formation in proteins by capsaicin in human erythrocytes subjected to oxidative stress. Phytot. Res. **20**, 303-306.

Marnet, L. J., 1999: Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Mutat. Res. **424**, 83-95.

Mäyrä-Mäkinen, A. and M. Bigret, 1998: Industrial use and production of lactic acid bacteria. In: S. Salminen and A. Von Wright eds. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. pp. 73-102. Marcel Dekker, New York.

Mazereeuw-Hautier, J., 2006: Formation médicale continue: Impétigo. Ann. Dermatol. Venereol. **133**, 194-207.

Mazur, P., 1970: The freezing of biological systems. Cryobiology **168**, 939-949.

Miyamoto-Shinohara, Y., F. Nozawa, J. Sukenobe and T. Imaizumi, 2010: Survival of yeasts stored after freeze-drying or liquid-drying. J. Gen. Appl. Microbiol. **56**, 107-119.

Miyamoto-Shinohara, Y., J. Sukenobe, T. Imaizumi and T. Nakahara, 2008: Survival of freeze-dried bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. **54**, 9-24.

Chapitre 1. Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens*

- Moneke, A. N., G. N. Okpala and C. U. Anyanwu, 2010: Biodegradation of glyphosate herbicide in vitro using bacterial isolates from four rice fields. *Afr. J. Biotechnol.* **9**, 4067-4074.
- Morgan, C. A., N. Herman, P. A. White and G. Vesey, 2006: Preservation of micro-organisms by drying. *J. Microbiol. Met.* **66**, 183-193.
- Nanasombat, S. and N. Sriwong, 2007: improving viability of freeze-dried lactic acid bacteria using lyoprotectants in combination with osmotic and cold adaptation. *Sci. Tech. J.* **7**, 61-67.
- Ongena, M., F. Daayf, P. Jacques, P. Thonart, N. Benhamou, T. C. Paulitz and R. R. Bélanger, 2000: Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with *fluorescent pseudomonads*. *Plant Pathol.* **49**, 523-530.
- Ongena, M., F. Daayf, P. Jacques, P. Thonart, N. Benhamou, T. C. Paulitz, P. Cornélis, N. Koedam and R. R. Bélanger, 1999: Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent pseudomonads: predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. *Plant Pathol.* **48**, 66-76.
- Ongena, M., E. Jourdan, M. Schäfer, C. Kech, H. Budzikiewicz, A. Luxen and P. Thonart, 2005: Isolation of an N-alkylated Benzylamine Derivative from *Pseudomonas putida* BTP1 as Elicitor of Induced Systemic Resistance in Bean. *Amer. Phytopat. Soc.* **18**, 562-569.
- Palmfeldt, J., P. Radström and B. Hahn-Hägerdal, 2003: Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. *Cryobiology* **47**, 21-29.

Chapitre 1. Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens*

- Pandey, B. V. and R. S. Upadhyay, 2010: *Pseudomonas fluorescens* can be used for bioremediation of textile effluent Direct Orange-102. *Trop. Ecolo.* **51**, 397-403.
- Paulsen, I. T., C. M. Press, J. Ravel, D. Y. Kobayashi, G. S. Myers, D. V. Mavrodi, R. T. Deboy, R. Seshadri, Q. Ren, R. Madupu, R. J. Dodson, A. S. Durkin, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, S. A. Sullivan, J. M. Rosovitz, M. L. Gwinn, L. Zhou, D. J. Schneider, S. W. Cartinhour, W. C. Nelson, J. Weidman, K. Watkins, K. Tran, H. Khouri, E. A. Pierson, L. S. Pierson, L. S. Thomashow and J. E. Loper, 2005: Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat. Biotechnol.* **23**, 873-885.
- Pembrey, R. S., K. C. Marshall and R. P. Schneider, 1999: Cell Surface Analysis Techniques: What Do Cell Preparation Protocols Do to Cell Surface Properties? *Appl. Environ. Microbiol.*, 2877–2894.
- Perry, S. F., 1998: Freeze-Drying and Cryopreservation of Bacteria. *Molecular Biotechnology* **9**, 59-64.
- Rey, L., 1965: Un développement nouveau de la lyophilisation: La cryodessiccation des systbmes non aqueux. . *Experientia* **21**, 241-304.
- Russo, A., M. Basaglia, S. Casella and M. P. Nuti, 2005: *Pseudomonas fluorescens* 134 as a Biological Control Agent (BCA) Model in Cell Immobilization Technology. *Biotechnol. Prog* **21**, 309-314.
- Santivarangkna, C., B. Higl and P. Foerst, 2008: Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food Microbiol.* **25**, 429-441.
- Santivarangkna, C., M. Wenning, P. Foerst and U. Kulozik, 2007: Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *J. Appl. Microbiol.* **102**, 748–756.

Chapitre 1. Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens*

- Saumaa, S., A. Tover, M. Tark, R. Tegova and M. Kivisaar, 2007: Oxidative DNA Damage Defense Systems in Avoidance of Stationary-Phase Mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **189**, 5504-5514.
- Selmer-Olsen, E., S.-E. Birkeland and T. Sorhaug, 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.
- Suzuki, Y. J., M. Carini and D. A. Butterfield, 2010: Protein Carbonylation. *Ant.t Red. Sign.* **3**, 323-326.
- Teixeira, P., H. Castro and R. Kirby, 1996: Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. *Let. Appl. Microbiol.* **22**, 34-38.
- Tripathi, P., A. Beaussart, A. Rolain, S. Lebeer, J. Vanderleyden, P. Hols and Y. Dufrêne, 2012: Towards a nanoscale view of lactic acid bacteria. *Micron* **43**, 1323-1330.
- Trögl, J., A. Chauhan, S. Ripp, A. C. Layton, G. Kuncová and G. S. Saylor, 2012: *Pseudomonas fluorescens* HK44: Lessons Learned from a Model Whole-Cell Bioreporter with a Broad Application History. *Sensors* **12**, 1544-1571.
- Vidhyasekaran, P. and M. Muthamilan, 1995: Development of formulations of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. *Amer. Phytopat. Soc.* **79**, 782-786.
- Volodymyr, I., 2010: Environmental microbiology for engineers. In: G. F. Taylor, eds ed. *Microbial ecology, Bioremediation.* pp. 89-98. Bookseller, New York USA.
- Walsh, U. F., J. P. Morrissey and F. O'Gara, 2001: *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Cur.Opin. Biotechnol.* **12**, 289-295.

Chapitre 1. Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens*

- Wong, W., K. Levi, B. Baddal, J. Turton and T. C. Boswell, 2011: Spread of *Pseudomonas fluorescens* Due to Contaminated Drinking Water in a Bone Marrow Transplant Unit. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 2093–2096.
- Yao, A. A., F. Bera, C. Franz, W. Holzapfel and P. Thonart, 2008: Survival Rate Analysis of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria Using the Arrhenius and z-Value Models. *J. Food Protect.* **71**, 431-434.
- Yao, A. A., B. Wathelet and P. Thonart, 2009: Effect of protective compounds on the survival, electrolyte leakage and lipid degradation of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11 during storage. *J. Microbiol. biotechnol.* **19**, 810-817.
- Zamora, L. M., C. Carretero and D. Parés, 2006: Comparative Survival Rates of Lactic Acid Bacteria Isolated from Blood, Following Spray-drying and Freeze-drying. *Food Sci. Tech. Int.* **12**, 77-84.
- Zhao, G. and G. Zhang, 2005: Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 333-338.